



Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
CICLO XXVII

**NUOVE FRONTIERE IN IMPLANTOLOGIA E
RIGENERAZIONE OSSEA IN CAMPO ODONTOIATRICO**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Barbara Zavan

Dottorando: Dott. Riccardo Guazzo

Indice

Indice	3
Riassunto	5
Abstract	7
Introduzione	9
I Difetti Ossei In Campo Odontoiatrico	9
Localizzazione Anatomica Dei Difetti Ossei In Campo Odontoiatrico.....	10
Impianti dentali	16
Peri-implantiti	20
Rigenerazione Ossea	22
Innesto Osseo.....	23
Rigenerazione Ossea In Campo Odontoiatrico	25
Rialzo Del Seno Mascellare	26
Rigenerazione Ossea Ed Infiammazione.....	28
Ingegneria Dei Tessuti	34
Biomateriali.....	35
Tessuti molli.....	39
Tessuti duri.....	41
Cellule Staminali.....	43
Applicazioni di terapia cellulare per la rigenerazione craniofacciale.....	48
Scaffold per terapia cellulare in difetti orali e craniofaciali	50
Scopo della tesi	53
Materiali e metodi	55
Biomateriali	55
Biomateriali naturali: test ex-vivo. Osso autologo.....	55
Biomateriali naturali: test in-vivo. Rialzo seno mascellare su pecora.....	59
Biomateriali naturali: test in-vivo. Difetto osseo peri-impanatre su cane	64
Biomateriali naturali: femore bovino.....	67
Biomateriali sintetici: test in-vitro	71
Membrane	72
Membrane naturali: pericardio bovino	72
Membrane sintetiche: polietilene glicole.....	81
Superfici implantari	83
Superfici implantari: test in-vitro	84

Risultati	89
Biomateriali	89
Biomateriali naturali: test ex-vivo. Osso autologo	89
Biomateriali naturali: test in-vivo. Rialzo seno mascellare su pecora.....	93
Biomateriali naturali: test in-vivo. Difetto osseo peri-implantare su cane	96
Biomateriali naturali: femore bovino	98
Biomateriali sintetici: test in-vitro.....	113
Membrane	115
Membrane naturali: pericardio bovino.....	115
Membrane sintetiche: polietilene glicole	119
Superfici implantari	122
Discussione	131
Conclusioni.....	141
Bibliografia.....	145

Riassunto

Il lavoro si è focalizzato sulla rigenerazione ossea, le membrane e le superfici implantari in campo odontoiatrico.

Partendo da una necessità clinica ampiamente condivisa nel settore odontoiatrico come quella della rigenerazione ossea guidata a fini implantologici, è seguito lo sviluppo di biomateriali, di membrane e di superfici implantari.

Per quanto riguarda i biomateriali sono state prima di tutto analizzate le caratteristiche di prelievi autologhi. I campioni raccolti sono stati conservati a diversi intervalli di tempo e processati per analisi di vitalità cellulare, sintesi proteica e per l'espressione genica. Dai risultati emerge come la conservazione a tempi prolungati in condizioni *ex vivo* induca un aumento della sintesi di proteine infiammatorie come il TNF- α . E' stato ricreato in un modello animale ovino una situazione di rigenerazione ossea in presenza di TNF- α indicando che tale stato induce un rallentamento nella formazione di nuovo osso anche in termini qualitativi.

Nell'ambito dello studio dei biomateriali sono stati studiati differenti protocolli di decellularizzazione per prelievi di osso eterologo. Successivamente *in vitro* e su modello animale si sono valutati dei sostituti ossei del commercio arricchiti con cellule staminali (SC). Sul cane è stato impiegato un biomateriale arricchito di cellule staminali associato ad impianto dentale. Ne è emerso che nei siti arricchiti con SC sia avvenuta una migliore integrazione. Su modello ovino sono stati effettuati rialzi del seno mascellare in cui si sono testati altri materiali arricchiti o meno con SC al fine di indagare la differente presenza di popolazioni cellulari e la capacità antinfiammatoria delle SC. Nei siti con presenza di SC la guarigione e la formazione di nuova matrice ossea appaiono più rapide e la reazione infiammatoria più contenuta.

Sono stati inoltre effettuati studi di biocompatibilità di sostituti ossei sintetici.

Riguardo le membrane sono stati sviluppati e testati *in vitro* differenti protocolli di decellularizzazione per il trattamento di membrane sviluppate da pericardio bovino. Successivamente le stesse sono state testate *in vivo* su modello murino.

Parallelamente è stata studiata *in vitro* una membrana sintetica di polietilene glicole con test MTT e con array per il controllo genetico. I risultati dimostrano esserne sicura l'applicazione e la PCR conferma il differenziamento cellulare in senso osteoblastico ed endoteliale.

Riguardo gli impianti dentali è stata studiata una nuova superficie implantare ionizzata e trattata con SC. Sono stati effettuati test *in vitro* e test PCR per indagare la tipologia di proteine che si sviluppava a contatto con la superficie. Tale trattamento consente una maggiore proliferazione cellulare, un maggior differenziamento cellulare con cellule che aderiscono con buona morfologia osteocitaria e che sono geneticamente stabili.

Abstract

The work focused on bone regeneration, membranes and implant surfaces in dentistry.

Starting from a clinical need widely shared in the dental field such as that of guided bone regeneration, were studied the development of biomaterials, membranes and implant surfaces. As for the biomaterials, were first analyzed the characteristics of autologous samples. The samples were stored at different time intervals and processed for analysis of cell viability, protein synthesis and gene expression. The results show how the preservation prolonged periods in conditions *ex vivo* induces an increased synthesis of inflammatory proteins such as TNF- α . Was recreated in an animal model a situation of sheep bone regeneration in the presence of TNF- α , indicating that such a state causes a slowdown in new bone formation also in qualitative terms.

Within the study of biomaterials have been studied different decellularization protocols for withdrawals heterologous bone. Later *in vitro* and animal model was used to evaluate the bone substitutes trade enriched with stem cells (SC). On the dog has been employed a biomaterial enriched in stem cell associated with dental implant. It was found that at sites enriched with SC has taken place better bone integration. On ovine model were performed in which the maxillary sinus lifts have tested other materials enriched with SC or less in order to investigate the presence of different cell populations and the ability of the anti-inflammatory SC. In sites with SC healing and formation of new bone matrix appear to be more rapid and more moderate inflammatory reaction.

Were also carried out studies of biocompatibility of synthetic bone substitutes.

Regarding the membranes were developed and tested *in vitro* different decellularization protocols for treat membranes developed from bovine pericardium. Later the same have been tested *in vivo* mouse model.

In parallel has been studied *in vitro* a synthetic membrane of polyethylene glycol with MTT assay and with arrays for genetic control. The results show be sure the application and PCR confirmation cell differentiation osteoblastic and endothelial.

About dental implants has been studied a new implant surface ionized and treated with SC. These tests were performed *in vitro* and PCR tests to investigate the type of protein that was developed in contact with the surface. This treatment allows a

greater cell proliferation, a higher cell differentiation with cells that adhere with good osteocitary morphology and that are genetically stable.

Introduzione

I Difetti Ossei In Campo Odontoiatrico

In medicina per “difetto” si intende una minorazione anatomica o funzionale che s’instaura in un individuo in esito a un qualsiasi processo morboso. Esso può essere originario, cioè presente nell’individuo sin dalla prima età, od acquisito (Treccani, 2010). Un difetto osseo è quindi una minoranza anatomica di tessuto osseo. I difetti ossei possono sorgere da molte cause come traumi, tumori, infezioni o malattie che colpiscono l’apparato scheletrico (Gardin et al., 2012b). Oggigiorno ci sono molte terapie per il trattamento di questi difetti, basate sull’uso di diversi materiali definiti come sostituti ossei (Swetha et al., 2010). L’evoluzione tecnologica, insieme ad una migliore comprensione dei processi biologici che intervengono nel processo di guarigione dell’osso, hanno portato allo sviluppo di molti sostituti ossei attualmente disponibili per il trattamento di questi difetti.

In campo odontoiatrico il difetto osseo è una mancanza di tessuto osseo intorno ad uno o più denti oppure la presenza di una ridotta quantità di osso a livello delle creste alveolari dovuta a diversi fattori eziologici. Esso può generarsi in seguito ad un incidente, ad una infiammazione, risultare da malattie parodontali oppure essere esito di riassorbimenti fisiologici. La malattia parodontale è una patologia frequente del cavo orale e colpisce le strutture di sostegno del dente (il parodonto), cioè la gengiva, i legamenti alveolo-dentari e l’osso alveolare. È una malattia a carattere infiammatorio che determina la formazione di tasche parodontali che a loro volta determinano danni a carico dell’osso alveolare con la conseguente riduzione della sua altezza causata dal riassorbimento osseo. Questo come danno ultimo causa la mobilità del dente e la sua successiva perdita in assenza di trattamento adeguato (Bjorn et al., 1965).

Al fine di correggere i difetti ossei si sono sviluppati diversi approcci terapeutici come il trapianto di sostituti ossei o innesti ossei (bone graft o bone scaffold) utilizzati, appunto, nella procedura di trapianto o innesto osseo (bone grafting). Un’operazione di innesto osseo è finalizzata alla ricostruzione dei processi alveolari e al riempimento di cavità in vista di una riabilitazione implantare. La sua funzione è quella di andare a stimolare la produzione di osso nuovo e vascolarizzato per ricostruire il tessuto perduto. Attualmente nel settore

odontoiatrico sono stati testati numerosi materiali con lo scopo di funzionare come veicoli osteoconduttivi nella riparazione dei difetti parodontali, post-estrattivi o di altra natura, agendo con un meccanismo denominato rigenerazione guidata dell'osso.

Localizzazione Anatomica Dei Difetti Ossei In Campo Odontoiatrico

In campo odontoiatrico la zona anatomica interessata da interventi di rigenerazione ossea si localizza frequentemente a livello dell'osso mascellare e, in maniera meno marcata, sull'osso mandibolare. Queste regioni fanno parte dello splancnocranio o massiccio frontale.

L'osso che sostiene i denti si chiama osso alveolare. E' composto da osso compatto e osso spugnoso o trabecolare. La parete esterna dell'osso è osso compatto, come il sottile strato che riveste la cavità alveolare nota come lamina dura. L'osso spugnoso è all'interno e contiene il midollo osseo. Il numero e la dimensione delle trabecole in questo osso sono determinati dall'attività funzione dell'organo. L'osso circostante il dente si chiama osso alveolare. Su questo si inseriscono le fibre del legamento parodontale (PDL).

L'osso è composto per il 65% in peso da materiale inorganico (principalmente idrossiapatite), per il 15% di acqua, per il 20% di materiale organico. La matrice organica è composta da collagene di tipo I (90-95%), proteine, glicoproteine, proteoglicani, fattori di crescita e proteine morfogenetiche dell'osso (es osteogenina) (Ferrus et al., 2010).

L'Osso Mascellare

È un osso pari e simmetrico; partecipa a realizzare l'arcata dentaria superiore e le principali cavità dello splancnocranio. Le due ossa mascellari si articolano medialmente attraverso il loro processo palatino formando gran parte del palato osseo.

Superiormente si articola con l'osso frontale, con l'osso etomide e con l'osso lacrimale, lateralmente con l'osso zigomatico, medialmente con l'osso palatino e il cornetto inferiore, posteriormente con l'osso sfenoide. Si descrivono un corpo e quattro processi: frontale, zigomatico, palatino e alveolare.

Il corpo ha la forma di una piramide triangolare; presenta, quindi, una base, un apice e tre facce: una anteriore, una posteriore e una superiore. La base, mediale e

sagittale, partecipa a delimitare le cavità nasali: viene per questo denominata faccia nasale. L'apice, laterale, corrisponde al processo zigomatico. Il corpo è scavato in un'ampia cavità, il seno mascellare, che si apre attraverso lo hiatus mascellare nella faccia nasale. Il seno riproduce essenzialmente la forma del corpo, ma talvolta risulta più sviluppato ampliandosi a spese dei processi.

La faccia nasale o base appare ampiamente incompleta per la presenza dell'apertura del seno mascellare davanti alla quale si riconosce, in posizione verticale, il solco naso-lacrimale, che viene trasformato nel canale naso-lacrimale dall'articolazione con l'osso lacrimale e il cornetto inferiore.

Anteriormente al solco naso-lacrimale, sulla radice del processo frontale, si trova la cresta conca, che rappresenta il punto articolare con il cornetto inferiore. Posteriormente allo hiatus mascellare si osserva una superficie rugosa che rappresenta l'area articolare per la faccia laterale della porzione verticale dell'osso palatino. Su questa superficie è presente una doccia pterigopalatina, che si sovrappone alla corrispondente dell'osso palatino per formare il canale pterigopalatino.

Sulla faccia anteriore dell'osso è presente una fossetta incisiva, punto d'origine all'omonimo muscolo. Lateralmente alla fossetta incisiva il grande sviluppo del dente canino estroflette la parete anteriore e realizza così la bozza canina che, lateralmente, delimita una piccola depressione, la fossa canina. Superiormente alla fossa canina si apre il foro infraorbitario, sbocco dell'omonimo canale attraversato dal nervo infraorbitario.

La faccia anteriore è delimitata da tre margini, uno anteriore, uno laterale e uno superiore (infraorbitario). Il segmento inferiore del margine anteriore si introflette nell'incisura nasale, mentre la porzione superiore si continua nel margine anteriore del processo frontale, partecipando così a delimitare l'apertura anteriore delle cavità nasali, l'apertura piriforme.

La faccia superiore, orbitaria, forma gran parte del pavimento della cavità orbitaria. Essa presenta, nel mezzo, il solco infraorbitario che origina in prossimità del suo margine posteriore, si porta in avanti e diviene progressivamente più profondo trasformandosi nel canale infraorbitario, che si apre nell'omonimo foro sulla faccia anteriore. Dal canale infraorbitario originano i canali alveolari anteriori per gli alveoli dei denti incisivi e del canino superiore. La faccia superiore è delimitata da tre margini, uno posteriore, uno mediale e uno anteriore

(infraorbitario). Il margine posteriore partecipa a delimitare, insieme alla grande ala dello sfenoide, la fessura orbitaria inferiore. Sul margine mediale si trova l'incisura lacrimale, inizio del solco naso-lacrimale descritto sulla faccia nasale.

La faccia posteriore o infratemporale concorre a delimitare la fossa infratemporale, presenta nel mezzo la tuberosità mascellare dalla quale originano i canali alveolari posteriori, destinati ai denti molari e attraversati dagli omonimi nervi.

Il processo frontale è rappresentato da una lamina ossea verticale, appiattita in senso trasversale, che origina dal margine mediale della faccia nasale. Presenta due facce, una laterale e una mediale, e tre margini liberi, uno anteriore, uno posteriore e uno superiore. Sulla faccia laterale si osserva una cresta lacrimale che, inferiormente, termina sulla incisura lacrimale della faccia superiore del corpo e lateralmente, si continua nel margine infraorbitario. Posteriormente alla cresta è presente una depressione che concorre, insieme all'osso lacrimale, a delimitare la fossa del sacco lacrimale; questa, a sua volta, si continua inferiormente nel canale naso-lacrimale. La faccia mediale del processo presenta due creste trasversali, una superiore, cresta etmoidale, che contrae rapporto con il cornetto medio dell'etmoide, e una inferiore, cresta conca, che si articola con il cornetto inferiore. Il margine anteriore nella metà inferiore è libero e delimita l'apertura piriforme, mentre nella metà superiore si articola con l'osso nasale. Il margine superiore si articola con l'osso frontale e quello posteriore con l'osso lacrimale.

Il processo zigomatico rappresenta la continuazione laterale dell'apice della piramide mascellare. Mostra tre facce corrispondenti alle facce del corpo e un apice, tronco notevolmente rugoso che si articola con l'osso zigomatico.

Il processo palatino è rappresentato da una lamina ossea quadrangolare orizzontale, appiattita in senso verticale, che si stacca dalla parte inferiore della faccia nasale. Si dirige medialmente e si articola con il processo palatino controlaterale realizzando la maggior parte del palato osseo. Si descrivono in esso una faccia superiore o nasale, una faccia anteriore o buccale e tre margini liberi uno anteriore, uno posteriore e uno mediale. La faccia superiore, liscia e leggermente concava, partecipa alla formazione del pavimento delle cavità nasali. La faccia anteriore, rugosa per la presenza di solchi vascolari, forma gran parte della volta della cavità buccale. Il margine anteriore concorre a delimitare l'apertura piriforme. Il margine mediale si articola con il controlaterale

partecipando a realizzare la sutura palatina mediana e anteriormente termina con la spina nasale anteriore. Posteriormente alla spina nasale anteriore si riconosce una sottile incisura che, con la corrispondente controlaterale, si trasforma nel canale incisivo. Il margine posteriore si articola con la lamina orizzontale dell'osso palatino partecipando alla costituzione della sutura palatina trasversa. La sutura palatina trasversa e la sutura palatina mediana insieme formano la sutura palatina crociata.

Il processo alveolare è organizzato in due lamine ossee parallele, una interna e una esterna, unite da una serie di setti trasversali, interdentali o interalveolari, che delimitano delle cavità dette alveoli dentali. La lamina esterna si continua con le facce anteriore e posteriore del corpo mascellare e, in corrispondenza degli alveoli, si estroflette formando i gioghi alveolari. La lamina interna si continua nella faccia inferiore del processo palatino.

Le cavità alveolari accolgono le radici dei denti e sono suddivise ulteriormente da setti interradicolarli quando accolgono denti con più radici. Ogni cavità alveolare o fossetta secondaria presenta alla base un orifizio che dà passaggio ai vasi e ai nervi per le radici dentarie (Fonzi, 2003).

L'osso Mandibolare

È un osso impari, mediano e simmetrico. Situato nella parte inferiore dello splancnocranio, viene suddiviso in un corpo e due porzioni laterali o rami. Il corpo ha la forma di ferro di cavallo con la concavità posteriore e presenta due facce, una esterna e una interna, e due margini, uno inferiore e uno superiore, sul quale prende impianto il processo alveolare. I rami, posteriori al corpo, assumono l'aspetto di lamine quadrilatera a direzione sagittale e dal loro margine superiore emergono un processo coronoideo e un processo condiloideo.

Sulla superficie esterna del corpo è presente un rilievo mediano triangolare con apice rivolto in alto, denominato protuberanza mentoniera o mentale. Il margine inferiore della protuberanza mentoniera si sovrappone al margine inferiore della mandibola e presenta sugli angoli laterali due tubercoli mentali. Lateralmente alla protuberanza mentale origina una cresta smussa che, portandosi indietro e in alto, termina sul margine anteriore del ramo mandibolare: è la linea obliqua esterna, sede di inserzione del muscolo buccinatore. Tra le radici del primo e del secondo premolare è presente il foro mentale che dà passaggio ai vasi e al nervo omonimi. Il

foro mentale rappresenta lo sbocco del canale mandibolare originato sulla faccia interna del ramo.

La faccia interna presenta sulla linea mediana una estroflessione appuntita, la spina mentale, frequentemente distinta in quattro piccoli tubercoli, le apofisi geni, che danno origine ai muscoli genioglossi superiormente e genioioidei inferiormente. Lateralmente alla spina mentale origina la linea obliqua interna o milioioidea che si porta postero-superiormente per terminare sul margine anteriore del ramo mandibolare; essa rappresenta l'origine dell'omonimo muscolo. La linea milioioidea concorre a separare due depressioni ossee, una superiore, la fossetta sottolinguale, e una inferiore, la fossetta sottomandibolare, che accolgono le rispettive ghiandole salivari. Inferiormente alla spina mentale si trova simmetricamente la fossetta digastrica, sede di inserzione del ventre anteriore del muscolo digastrico.

Il margine inferiore del corpo risulta smusso e liscio, mentre il margine superiore porta il processo alveolare, costituito da due lamine ossee parallele, esterna e interna, unite da una serie di setti interdentali o interalveolari che delimitano le cavità alveolari. Le cavità alveolari presentano setti interradicolari che le suddividono ulteriormente quando appartengono a denti con più radici. Il processo alveolare non segue esattamente la curvatura del margine superiore del corpo; infatti, appare sporgente medialmente, soprattutto nella sua estremità posteriore. Il differente raggio di curvatura del corpo e del processo alveolare consente di individuare una superficie ossea triangolare, triangolo retromolare, compresa tra processo alveolare, margine superiore del corpo e, posteriormente, ramo mandibolare.

Sui rami mandibolari si descrivono due facce, laterale e mediale, e tre margini liberi: anteriore, posteriore e superiore. La faccia laterale nella sua porzione inferiore mostra una superficie rugosa, la tuberosità masseterina, che dà inserzione al muscolo massetere.

La faccia mediale presenta al centro un foro, il foro mandibolare, circoscritto da una laminetta ossea variamente sviluppata, la lingula o spina mandibolare dello Spix. Il foro mandibolare rappresenta l'origine del canale mandibolare, percorso dal nervo e dai vasi alveolari inferiori.

All'origine il suo calibro è di circa 4 mm e diminuisce progressivamente per arrivare a 2 mm. Nel suo insieme il canale realizza una curva a concavità antero-

superiore e, nel portarsi lateralmente, incrocia a X l'asse del corpo e la linea di proiezione del processo alveolare. Il suo percorso può essere suddiviso in tre segmenti: uno posteriore, uno medio e uno anteriore. Il segmento posteriore obliquo in basso e in avanti è accolto nel ramo mandibolare. Il segmento medio, quasi orizzontale, attraversa il corpo ed è situato mediamente a 6 mm dall'apice radicolare del 3° molare, a 7 mm dall'apice radicolare del 2° molare e a 9 mm dal 2° premolare. Progressivamente si avvicina alla faccia laterale del corpo e al suo margine inferiore dal quale dista, nel punto più declive, 8-10 mm. Il segmento anteriore comincia in prossimità dell'apice radicolare del 2° premolare, si porta in avanti, in alto e lateralmente per terminare, dopo circa 1 cm, nel foro mentoniero. Il rapporto del canale con il 3° molare è molto variabile in relazione alla posizione normale o patologica del dente stesso. Dal canale mandibolare si staccano, a livello di ciascuna radice, dei canali secondari ascendenti che si portano al fondo delle cavità alveolari. A livello del 2° premolare un canale più lungo, il canale incisivo, si porta sul fondo alveolare dell'incisivo centrale dopo aver dato origine ai canali per il canino e l'incisivo laterale.

Dal contorno inferiore del foro mandibolare parte un solco diretto obliquamente in basso e in avanti, il solco miloioideo, percorso dal nervo e dai vasi omonimi. Dal contorno superiore del foro mandibolare origina una cresta smussa che, portandosi in alto e indietro, termina sull'angolo mediale del condilo mandibolare: è la cresta del condilo, che rappresenta il punto di maggior sollecitazione del ramo stesso. Inferiormente e posteriormente al foro mandibolare è presente una superficie rugosa che dà inserzione al muscolo pterigoideo interno.

Dal margine superiore del ramo emergono il processo coronoideo anteriormente e il processo condiloideo posteriormente, separati dall'incisura semilunare o mandibolare o sigmoidea. Il processo condiloideo risulta formato da un collo che sorregge un condilo, sul quale si estende una superficie articolare che guarda in alto e in avanti. Gli assi maggiori dei due condili risultano obliqui e prolungati medialmente; si incontrano in prossimità del margine anteriore del grande foro occipitale, dove delimitano un angolo di 150-160° aperto in avanti. L'incisura mandibolare posteriormente termina in corrispondenza del collo del condilo con il quale realizza la fossetta pterigoidea che dà inserzione al muscolo pterigoideo esterno. Il processo coronoideo triangolare e appiattito in direzione trasversale, presenta un margine posteriore concavo che si continua nell'incisura mandibolare

e un margine anteriore inizialmente convesso poi concavo in prossimità della confluenza con il ramo mandibolare.

Sulla superficie mediale del processo coronoideo è riscontrabile una cresta, la cresta temporale, che, formatasi in prossimità dell'apice, si porta verticalmente in basso per poi divenire orizzontale e terminare in corrispondenza del processo alveolare. La cresta temporale dà inserzione al muscolo temporale e contribuisce a delimitare il triangolo retromolare. Il margine posteriore del ramo mandibolare si continua nel margine inferiore del corpo in corrispondenza dell'angolo mandibolare (Fonzi, 2003).

Impianti dentali

I denti mancanti sono stati tradizionalmente sostituiti con protesi rimovibili o ponti fissi che permettono il ripristino della masticazione, la funzione fonetica ed estetica. La sostituzione della dentatura persa è stata fatta risalire alle antiche civiltà egiziane e del Sud America. In antichi scritti egizi animali con impianti e denti d'avorio intagliato sono stati i più antichi esempi di implantologia primitiva.

Nel XVIII e XIX secolo in Inghilterra e nell'America coloniale, gli individui poveri vendevano i loro denti per l'estrazione e il successivo impianto in destinatari facoltosi. I risultati clinici di questi dentature trapiantate erano l'anchilosi o il riassorbimento radicolare. La continua ricerca ha prolungato la sopravvivenza dell'allograpianto, ma non ne ha migliorato sensibilmente la prevedibilità.

Nel 1809 Maggiolo ha collocato un impianto immediato in oro in un sito di estrazione recente con l'aspetto coronale dell'impianto sporgente appena sopra la gengiva. Le complicanze postoperatorie includevano forte dolore e l'infiammazione gengivale. Da allora vari materiali da impianto sono stati utilizzati: da superfici di piombo ruvide che ricoprivano perni di platino ai tubi di oro e iridio. Adams nel 1937 brevettò un impianto cilindrico filettato con testa a sfera avvitata per fornire ritenzione all'overdenture in modo simile a come che si fa tutt'oggi.

Fino a questo punto il successo implantare era marginale, con una longevità massima di pochi anni. Strock ha posizionato il primo impianto endosseo a lungo termine ad Harvard nel 1938. Questo impianto era una vite filettata in cobalto-cromo-molibdeno con una testa conica per la cementazione di una corona.

L'impianto è rimasto stabile e asintomatico fino al 1955, momento in cui il paziente è morto in un incidente d'auto. Strock ha scritto: "Le sezioni istologiche degli impianti in uno studio sui cani hanno mostrato notevole tolleranza completa dell'impianto dentale...". Strock ha dimostrato per la prima volta che impianti dentali metallici endossei sono tollerati negli esseri umani, con un tasso di sopravvivenza fino a 17 anni.

A causa di un'insufficiente altezza dell'osso alveolare in alcuni siti, sono stati sviluppati impianti sottoperiosteali. Nel 1943 Dahl ha collocato una struttura metallica sulla cresta alveolare mascellare con quattro perni sporgenti. Molteplici varianti di questo progetto iniziale sono state realizzate, ma questi dispositivi spesso hanno portato a deiscenza della ferita. Gli impianti a lama sono stati introdotti da Linkow e da Roberts e Roberts. Ci sono state numerose configurazioni con ampie applicazioni, e gli impianti sono diventati il dispositivo più largamente usato in implantologia negli Stati Uniti e all'estero.

Un impianto filettato in titanio in due fasi a forma di radice è stato presentato in Nord America da Brånemark nel 1978, e ha mostrato che dispositivi in titanio, impiantati in femori di conigli, si osteointegravano dopo un periodo di guarigione. Impianti in titanio in due fasi sono stati collocati in pazienti nel 1965 e gli studi hanno mostrato una sopravvivenza prolungata, il mantenimento dell'osso e un significativo miglioramento del rapporto benefici-rischi rispetto a tutti gli impianti precedenti. Questa innovazione ha rivoluzionato la ricostruzione maxillofaciale. Successivamente, vari disegni implantari sono stati fabbricati e la ricerca in implantologia è cresciuta in modo esponenziale. Le frontiere dell'implantologia stanno rapidamente avanzando e l'estetica continua ad essere parte integrante di questo progresso (Tjellstrom et al., 1985).

Nel 1977 Brånemark ha presentato il suo lavoro di ricerca svolto in 10 anni in cui dimostra che l'osso può crescere sulla superficie di impianti in titanio (Branemark et al., 1977). Il concetto ormai ben accettato, chiamato osteointegrazione, è stato senza dubbio una delle più importanti scoperte scientifiche in odontoiatria negli ultimi 30 anni. Una moltitudine di disegni implantari sono stati commercializzati e le situazioni cliniche in cui protesi impiantate e osteointegrate vengono utilizzate sono aumentate enormemente.

Uno dei fattori chiave per il successo a lungo termine degli impianti dentali è il mantenimento dei tessuti sani circostanti. E' stato dimostrato un rapporto di

causa-effetto tra l'accumulo di placca batterica e lo sviluppo di alterazioni infiammatorie nei tessuti molli circostanti gli impianti dentali (Pontoriero et al., 1994). Se questa condizione reversibile, chiamata 'mucosite peri-implantare', è lasciata non trattata, può portare alla progressiva distruzione dei tessuti di sostegno all'impianto (peri-implantite) e, infine, al suo fallimento. (Tonetti and Mombelli, 1999).

I tassi di sopravvivenza cumulativi in 20 anni di impianti corti e standard erano di 92,3 e 95,9%, rispettivamente. Le percentuali cumulative di successo erano del 78,3 e del 81,4%. I tassi di sopravvivenza di impianti corti in regioni posteriori e anteriori erano comparabili: 95 e 96,4%, rispettivamente. (Lops et al., 2012).

La terapia implantare è oggi un'importante branca dell'odontoiatria che è in continua evoluzione grazie anche all'interesse scientifico di molte aziende. Gli stessi pazienti richiedono una terapia implantare per ottenere una protesi fissa che imiti al meglio il dente naturale. La terapia implantare può essere utilizzata anche per stabilizzare dentiere, e così garantire al paziente un maggiore comfort, sia masticatorio che fonetico ed estetico.

L'introduzione di impianti osteointegrati ha aperto nuove possibilità per migliorare la capacità di masticare in soggetti edentuli che utilizzano protesi rimovibili. Oltre alle protesi dentali fisse, gli impianti possono essere utilizzati anche per migliorare la funzione delle protesi rimovibili con l'uso di vari sistemi di ritenzione.

Il limite della terapia implantare è la quantità insufficiente di osso: il riassorbimento e il rimodellamento della cresta alveolare è un processo che si verifica soprattutto dopo l'estrazione del dente e si traduce in una ridotta dimensione della cresta (Araujo and Lindhe, 2005; Schropp et al., 2003). Il volume e la velocità di perdita ossea dipendono da diversi fattori come il sesso, gli ormoni, la patologia generale, riabilitazione dentale e il metabolismo (Guler et al., 2005). La maggior quantità di riassorbimento si verifica durante i primi 3 mesi di guarigione con una perdita significativa di altezza e larghezza dell'osso alveolare (Kerr et al., 2008; Schropp et al., 2003). Le variazioni dimensionali orizzontali consistono per il 50% di riduzione della cresta alveolare dopo 1 anno dall'estrazione del dente (Schropp et al., 2003). Il riassorbimento si verifica principalmente sotto l'aspetto vestibolare, con significativamente meno riassorbimento sotto l'aspetto linguale (Araujo and Lindhe, 2005). Il riassorbimento della cresta alveolare di solito è più

rapido nella regione premolare e molare rispetto alla regione anteriore della mandibola (Saglam, 2002).

Dopo l'estrazione dei denti, nella regione mandibolare anteriore c'è una maggiore disponibilità di osso basale e non ci sono punti di riferimento anatomici che possono essere compromessi per l'inserimento dell'impianto, come avviene nella regione mascellare anteriore. Oikarinen e colleghi suggeriscono che le protesi di 8 mm o più possono essere inserite nella mascella anteriore in più del 50% dei pazienti. In mandibola è emerso che l'impianto era possibile in quasi ogni caso con dispositivi di 8 mm o più nelle regioni canine (Oikarinen et al., 1995). Invece, nella regione mascellare posteriore, la percentuale di siti con altezza ossea ≥ 8 mm e larghezza ossea ≥ 6 mm era del 28,3%, 18,4%, 8,0% e il 18,2% nel sito del primo premolare, secondo premolare, primo molare e secondo molare, rispettivamente (Pramstraller et al., 2011). L'uso di protesi rimovibili aumenta significativamente la gravità di riassorbimento dell'osso alveolare nelle zone edentule. Xie e colleghi hanno evidenziato che il mascellare edentulo ha una maggiore riduzione nelle altezze rispetto alla mandibola edentula per entrambi i sessi. La scoperta è considerata in accordo con lo studio di Tallgren (Tallgren, 1972; Xie et al., 1997).

Oltre al problema di edentulia, le lesioni causate da traumi, dalla resezione di tumori o cisti, da malattie infettive, e anche da condizioni congenite e di sviluppo (ad esempio, difetti di palatoschisi) possono risultare in gravi sequele funzionali, estetiche e psicologiche (Cohen, 1995; Hunt and Hobar, 2003). In tali situazioni, l'assenza di tessuti duri e molli può essere deturpante e spesso può compromettere le funzioni di base come la masticazione, linguaggio, deglutizione, e anche limitare la protezione termica e fisica di importanti strutture anatomiche (cioè il cervello, nervi, arterie, vene) (Curtis et al., 1997; Davis and Telischi, 1995; Kadota et al., 2008; Urken et al., 1991). La progressione di alcune condizioni orali può anche provocare difetti cranio-facciali di difficile risoluzione. Per esempio, la parodontite è una malattia cronica infiammatoria ad eziologia batterica, caratterizzata dalla perdita di supporto intorno ai denti, con riassorbimento dell'osso alveolare e alterazioni dei tessuti molli (Feng and Weinberg, 2006; Genco, 1992; Kinane and Bartold, 2007).

Il raggiungimento di rigenerazione prevedibile nel trattamento dei difetti craniofacciali è notevolmente impegnativo nella maggior parte degli scenari clinici. Un'altra causa frequente del riassorbimento osseo è la perimplantite. La

perimplantite è definita come l'infiammazione dei tessuti peri-implantari, accompagnata da cambiamenti a livello della cresta ossea e dalla presenza di sanguinamento al sondaggio e/o suppurazione, con o senza concomitante approfondimento delle tasche peri-implantari (Lang et al., 2011).

La perimplantite è un grave problema attuale perché né le cause né le terapie sono attualmente chiare.

Peri-implantiti

La terapia implantare è un metodo consolidato di sostituire i denti mancanti. Si possono raggiungere ottimi risultati a lungo termine, ma possono verificarsi complicazioni biologiche. Le complicanze biologiche più comuni erano legate all'igiene: il 30,2% dei pazienti mostrava mucosite peri-implantare e 10,4% perimplantiti (Francetti et al., 2013).

La perimplantite è definita come una progressiva perdita di osso marginale causata dalla placca, osservabile in radiografia con segni clinici di infezione dei tessuti molli peri-implantari.

Il verificarsi della perimplantite non è un fenomeno raro. In uno studio di coorte singola (Roos-Jansaker et al., 2006), la perimplantite, definita come una perdita di osso marginale di 3 mm o più in combinazione con sanguinamento al sondaggio o con pus o con entrambi, è stata diagnosticata nel 16% dei pazienti trattati con impianti Brånemark torniti da 9 a 14 anni dopo il carico. E' probabile che il verificarsi di perimplantite intorno agli impianti con superfici ruvide sia ancora più frequente, in quanto è stato osservato in un'altra revisione sistematica Cochrane (Esposito et al., 2007) che, a livello statisticamente significativo, si verificano più peri-implantiti a 3 anni di carico intorno agli impianti con superfici ruvide rispetto a impianti lisci Brånemark. In una recente consensus conference, Klinge e Meyle riportato che la prevalenza di peri-implantite per un periodo di 5-10 anni successivo all'inserimento dell'impianto è stata nell'ordine del 10% degli impianti e del 20% dei pazienti (Klinge et al., 2012).

Cecchinato ha mostrato come, durante il periodo di follow-up di 10 anni, il 12% dei pazienti e il 5% degli impianti mostravano segni di perimplantite (perdita ossea > 0,5 mm BoP +, PPD ≥ 6 mm) (Cecchinato et al., 2014). La gengiva cheratinizzata ha dimostrato di promuovere la salute dei tessuti molli intorno ai denti. Tuttavia,

intorno agli impianti dentali, la presenza di gengiva cheratinizzata può essere importante per la conservazione dell'osso crestale. Krekeler e colleghi hanno suggerito che esiste una forte correlazione tra la gengiva cheratinizzata e il fallimento dell'impianto e l'assenza di una banda adeguata di mucosa cheratinizzata che circonda il pilastro protesico. Questa relazione era basata sulla capacità della mucosa cheratinizzata di resistere agli insulti batterici che può portare a perimplantiti (Krekeler et al., 1985). La gengiva cheratinizzata consente una migliore tenuta marginale, mantenendo un collare mucoso che impedisce l'accesso dei batteri nei tessuti sottostanti. Questi batteri possono mantenere delle condizioni infiammatorie dannose per i tessuti duri e molli peri-implantari. La revisione sistematica della Brito conclude che la presenza di un'adeguata zona di tessuto cheratinizzato può essere necessaria perché è stato dimostrato essere correlata ad una migliore salute dei tessuti peri-implantari (Brito et al., 2014). Dagli studi di Lang, Lindhe e Schou, condotti su modelli animali in cui sono state indotte sperimentalmente la perimplantite e la parodontite, è evidente che il permanere della placca patologia peri-implantare è un fattore chiave. La placca è un biofilm ricco di batteri. I batteri intorno ai denti e agli impianti hanno caratteristiche molto simili: i siti che mostrano un'infiammazione parodontale e peri-implantare con biofilm diffuso, contengono una notevole quantità di batteri gram-negativi. Il trattamento principale delle perimplantiti si basa sulla risoluzione della lesione infiammatoria. In esperimenti su animali condotti da Ericsson, Persson e Lindhe, le lesioni peri-implantari indotte sperimentalmente sono state successivamente sottoposte a terapia. Agli animali sono stati somministrati antibiotici sistemici, mentre il trattamento locale è stato eseguito solo su alcuni dei siti implantari colpiti dalla peri-implantite. Dopo diversi mesi di guarigione, nei siti implantari in cui è stata effettuata anche la terapia locale, ovvero la pulizia meccanica sottogengivale, le lesioni infiammatorie erano guarite, mentre siti in cui non era stato effettuato il trattamento locale presentavano ancora l'infiltrato infiammatorio nella mucosa e nell'osso. Il trattamento antibiotico della perimplantite deve essere abbinato ad una rimozione meticolosa del biofilm dalla superficie contaminata dell'impianto. Per concludere si può affermare che le lesioni causate dalla perimplantite sono poco capsulate, estese all'interno del tessuto osseo marginale e possono portare, se lasciate progredire, alla perdita dell'impianto. I sintomi della perimplantite sono legati alle lesioni

infettive/infiammatorie. Pertanto si hanno segni radiografici di perdita di massa ossea, che sembra simili ad un cratere. Possono verificarsi con frequenza gonfiore e arrossamento della mucosa, ma anche sanguinamento dopo un leggero sondaggio e suppurazione. Tuttavia l'impianto potrebbe comunque rimanere stabile per lunghi periodi di tempo (Lindhe, 2009).

Rigenerazione Ossea

Quando si parla di rigenerazione dell'osso, in quanto tessuto compatto per eccellenza, si fa riferimento all'uso dei biomateriali nella ricostruzione degli hard tissues. L'innesto osseo o bone grafting è possibile perché il tessuto osseo, diversamente da molti altri tessuti, ha la capacità di rigenerarsi completamente a condizione che abbia lo spazio nel quale crescere. Come l'osso naturale, generalmente il materiale impiantato rimpiazza il tessuto perduto completamente, dando come risultato una regione completamente integrata di osso nuovo.

In più uno scaffold, per avere successo nell'ingegneria tissutale ossea, deve somigliare il più possibile alla morfologia dell'osso naturale, e in particolare deve mimare la struttura biologica della MEC. Essa è fondamentale per l'adesione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule (Seyedjafari et al., 2011).

Le caratteristiche fondamentali che deve possedere un biomateriale utilizzato per la rigenerazione ossea, oltre alle caratteristiche precedentemente menzionate, sono:

- Osteoconduttività: si riferisce all'abilità dell'innesto di assicurare l'adesione, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule osteogeniche, fornendo una struttura interconnessa attraverso la quale le nuove cellule possono migrare e i nuovi vasi si possono formare (Finkemeier, 2002);
- Osteogenicità: implica la presenza di osteoblasti nel sito di innesto, i quali sono in grado di sintetizzare direttamente nuovo tessuto osseo (Finkemeier, 2002);
- Osteoinduttività: si riferisce all'abilità dell'innesto di indurre la stimolazione di cellule staminali non differenziate (o osteoprogenitrici) dai tessuti circostanti a differenziarsi in osteoblasti (Finkemeier, 2002);
- Osteointegrazione: descrive la capacità di interazione tra il materiale trapiantato e l'osso dell'ospite. Indica il diretto ancoraggio all'impianto attraverso la formazione di materiale osseo attorno a quest'ultimo senza che

nasca tessuto fibroso all'interfaccia impianto-osso (Albrektsson and Johansson, 2001).

Il gold standard è rappresentato dal trapianto di osso autologo, in quanto dotato di tutti gli elementi chiave richiesti per la rigenerazione ossea. Esso, infatti, è un innesto osteoconduttivo e porta con sé in situ cellule con un alto potenziale osteogenico e fattori di crescita che stimolano sia la formazione di osso (osteoconduttività) sia la vascolarizzazione del nuovo osso.

Innesto Osseo

Gli innesti ossei possono essere autologhi, se ricavati dallo stesso paziente nel quale dovranno essere inseriti; o eterologhi, se derivanti da altri soggetti. In particolare vengono definiti allogenici i trapianti che provengono da un individuo della stessa specie del ricevente e xenogenici quelli provenienti da specie diverse (es. da specie bovina) (Di Bello C, 2009). Oltre ai sostituti ossei di origine naturale, come i sopra menzionati, si hanno a disposizione anche innesti sintetici. Rientrano in questa categoria le ceramiche, i polimeri, i derivati dell'acido ialuronico (HA) e del calcio fosfato e solfato.

Innesti Autologhi

Gli innesti autologhi o autografts sono biomateriali naturali in cui donatore e ricevente coincidono, ovvero il materiale osseo viene prelevato dallo stesso paziente dove poi sarà utilizzato. È una pratica comune in chirurgia e solitamente si utilizza la cresta iliaca come sito donatore, per motivazioni sia di qualità che di quantità. In ambito odontostomatologico si ricorre al mento, al corpo e ai rami mandibolari, al processo zigomatico. Viene utilizzato sia tessuto spongioso fresco che, in minor misura, tessuto corticale (Haas et al., 2002).

Il trapianto autologo è considerato il gold standard in tutte le affezioni ortopediche ed odontoiatriche che richiedono l'uso di innesti. L'impiego di materiale appartenente al paziente stesso evita problemi di rigetto, non induce alcuna risposta immunologica, e protegge dalla potenziale trasmissione di malattie infettive (Sanz-Herrera et al., 2010; Sciadini and Johnson, 2000).

Nonostante queste caratteristiche l'autotrapianto in generale è associato a numerosi effetti collaterali, includendo dolore post-operatorio, possibilità di un doppio intervento, formazioni di ematomi, emorragie, danni nervosi ed infezioni

(Arrington et al., 1996). Inoltre la disponibilità del materiale è limitata e questo non lo rende adatto alla correzione di difetti di grande entità.

Innesti Eterologhi: Allografts e Xenografts

Sono tessuti ossei ricavati da individui della stessa specie (allografts) o da specie diverse (xenografts), rispetto al soggetto ricevente (Van Heest and Swiontkowski, 1999). Tuttavia questi tipi di innesti comportano un elevato rischio di trasmissione di malattie e risposte immunitarie; per questo motivo gli innesti ossei prima di essere impiantati devono essere sottoposti a trattamenti di decellularizzazione. L'eliminazione della componente cellulare è indispensabile per l'utilizzo di questi materiali come scaffold, in quanto le cellule presentano sulla superficie della loro membrana delle proteine che possono fungere da antigeni per il sistema immunitario del ricevente. Tale eliminazione può essere ottenuta mediante diversi protocolli di decellularizzazione, i quali hanno come scopo quello di eliminare la componente cellulare mantenendo solo la componente matrice priva di antigeni riconoscibili (Badylak et al., 2011).

L'allograft mantiene capacità osteoconduttive e osteoinduttive, tuttavia esso è privo di osteogenicità. L'osteoiduzione viene mantenuta in quanto le tecniche di decellularizzazione non alterano i fattori di crescita presenti nel materiale osseo (in particolare le BMP-2), mentre la possibilità osteogenica viene a mancare proprio a causa di tali processi (Haas et al., 2002).

Gli xenografts sono innesti naturali provenienti da specie diverse da quella del ricevente e normalmente vengono prodotti e stoccati in banche dell'osso specializzate (Haas et al., 2002). Da molti anni, la fonte animale principalmente utilizzata per la creazione di questo tipo di innesto è la specie bovina (*Bos taurus*). I vantaggi di questi innesti sono sovrapponibili a quelli degli allografts, con l'aggiunta che le tecniche di produzione e i protocolli di decellularizzazione, a differenza degli allografts, sono standardizzati. La conseguente uniformità di questi tessuti garantisce l'immissione sul mercato di prodotti aventi caratteristiche simili e comportamenti prevedibili. Importante è, per gli xenografts, garantire la completa sterilizzazione, in quanto potrebbero essere un'importante fonte di zoonosi (Haas et al., 2002).

Innesti Sintetici

Sono biomateriali sintetizzati ex novo in laboratorio, al fine di mimare al meglio le caratteristiche del tessuto osseo. La rugosità di superficie, la porosità, l'ultrastruttura e la presenza di fattori di crescita devono essere simili a quelle del tessuto osseo e devono essere facili da maneggiare (Bauer and Muschler, 2000). Tra questi esistono biomateriali costituiti da:

- Ceramiche: a base di fosfato di calcio, come l'idrossiapatite (HA) e β - fosfato tricalcico (TCP), sono diffusamente utilizzate nella rigenerazione del tessuto osseo per la loro elevata biocompatibilità con le cellule e il tessuto osseo;
- Polimeri: di origine sintetica. Copolimeri di acido polilattico e poliglicolico sono prodotti di sintesi, altamente biocompatibili, non inducono reazioni immunologiche o infiammatorie, sono dotati di capacità osteoconduttive.

Gli innesti sintetici hanno diversi vantaggi come la disponibilità illimitata e una vasta gamma di scelta, inoltre possono essere utilizzati da soli o in combinazione tra di loro ed abbinandoli anche a fattori di crescita. Tuttavia essendo dei materiali estranei all'organismo, gli innesti sintetici presentano il rischio di generare, se pur minima, una reazione immunitaria. In più, essendo materiali creati in laboratorio, presentano costi abbastanza elevati, fattore che limita l'impiego (Haas et al., 2002). La scelta della tipologia di innesto per la rigenerazione ossea è guidata, oltre che dall'entità del danno da riparare e quindi dalla conseguente quantità di materiale da utilizzare, anche dalle proprietà del materiale stesso (Tabella 1).

	Osteoconduttività	Osteoinduttività	Osteogenicità
<i>Autograft</i>	+	+	+
<i>Allograft</i>	+	+/-	-
<i>Xenograft</i>	+	-	-

Tabella 1: caratteristiche dei biomateriali

Rigenerazione Ossea In Campo Odontoiatrico

Il bone grafting, cioè il trapianto di osso, in odontoiatria è una pratica chirurgica che ripristina o aumenta l'osso attorno al dente o dove ve ne sia la necessità. Nella pratica, viene impiegato nel trattamento di diverse affezioni che colpiscono la mandibola, la mascella e gli alveoli dentali. I processi alveolari dell'osso mascellare

sono spesso soggetti a fenomeni di pneumatizzazione e atrofia ossea, la prima causata da normali processi di erosione ossea dovuta alla masticazione, mentre la seconda è un esito di eventi congeniti (Smiler et al., 1992). In entrambi i casi non è possibile l'utilizzo di protesi fisse nella risoluzione di edentuliti parziali o totali; infatti, questi tipi di impianti richiedono uno spessore dell'osso mascellare sufficiente a supportare la sua canalizzazione e l'inserimento del sostituto dentale (Chen et al., 2007).

Gli impianti dentali richiedono un buon supporto osseo per poter rimanere in sede e dare vita ad un'appropriata integrazione con il tessuto circostante. Quindi, prima di procedere con l'inserimento di un impianto ad osteointegrazione fissa, è necessario valutare lo strato osseo a disposizione. La quantità e la qualità della massa ossea viene valutata mediante tecniche diagnostiche specifiche (tecniche a raggi-X), e se viene considerata insufficiente per l'impianto, si procede con l'innesto di materiale per aumento dell'osso. Per ovviare a questi problemi, è ormai consolidato l'intervento di rialzo del seno mascellare, che consiste appunto nell'aumento di spessore dei processi alveolari attraverso l'utilizzo di biomateriali (C, 2011; Chen et al., 2007; Ogunsalu, 2011).

Questo materiale agisce, come spiegato in precedenza, come una matrice nella e sulla quale l'osso del paziente può crescere. Si può ricorrere all'uso di un trapianto autologo, prelevando l'osso dal mento o dalla cresta iliaca, ed inserirlo nella bocca al di sotto del nuovo impianto, oppure utilizzare biomateriali eterologhi, che da soli o in combinazione con cellule, riescono ad ottenere il risultato desiderato senza sottoporre il paziente a doppio intervento (prelievo dell'osso e posizionamento di questo) (Aalam).

Rialzo Del Seno Mascellare

L'aumento o rialzo del seno mascellare è una procedura relativamente comune nella chirurgia orale, pensata per aumentare lo spessore dell'osso mascellare così da poter attuare dei lavori di ricostruzione, come la possibilità di effettuare l'impianto di sostituti ossei ad integrazione fissa. La finalità è quella di incrementare la quantità di osso nella parte posteriore della mascella, nell'area tra i denti premolari e molari. La perdita del dente, causata da vari fattori, può andare a diminuire lo spessore del pavimento del seno mascellare e rendere difficoltosa l'osteointegrazione degli impianti. Tale procedura può avvenire in un momento

precedente all'intervento implantare (Rigenerazione Ossea Preimplantare) o contemporaneamente (Rigenerazione Ossea Perimplantare). L'elemento determinante per la scelta della tipologia di rigenerazione è lo spessore osseo del paziente, infatti se è molto sottile (meno di 2 mm) si preferisce procedere con una rigenerazione ossea preimplantare.

La pratica chirurgica avviene compiendo un'incisione in direzione antero-crestale. Sollevando il tessuto mucoperiostale, si ha accesso alla parete laterale del seno. Tramite apposite lame, si procede con una osteotomia. La parete laterale del seno viene ridotta ad uno strato sottile di osso tanto da poter rendere visibile nell'intera area la membrana di Schneider (mucosa del seno). In seguito il sottile strato rimasto di osso viene rimosso. La membrana del seno, partendo dal bordo superiore procedendo verso quello inferiore, viene delicatamente e completamente dissociata dalla parete mediale inferiore della parete del seno. Questa operazione chirurgica deve essere effettuata con molta delicatezza ed attenzione poiché potrebbe portare alla lacerazione della membrana portando ad una perdita del materiale innestato. Al termine della dissociazione della membrana si crea la botola. Una volta delineata la botola si procede con il completo riempimento della cavità. Al termine del posizionamento del materiale, la botola viene richiusa mediante l'apposizione di una membrana al fine di isolare il sito di innesto per promuovere la formazione di osso e prevenire l'invasione dei tessuti molli (de Vicente et al., 2010).

Uno dei maggiori rischi nell'operazione del rialzo del seno mascellare è l'eventualità di perforare o lacerare/strappare la membrana del seno. Oltre allo strappo della membrana, ci sono altri rischi legati alla pratica chirurgica di rialzo del seno mascellare. Tali rischi includono:

- Infezioni;
- Infiammazione, che può compromettere la formazione di nuovo tessuto osseo;
- Reazioni allergiche, anche dovute all'uso del biomateriale se esso non è stato sterilizzato adeguatamente;
- Dolore;
- Danneggiamento del tessuto circostante e/o del nervo;
- Ematomi;

- Perdita dell'impianto.

Rigenerazione Ossea Ed Infiammazione

Una delle problematiche legate all'utilizzo dei biomateriali per la rigenerazione ossea è l'infiammazione. Gli innesti di origine naturale, autologhi ed eterologhi, sono quelli più soggetti allo sviluppo di una reazione da parte dell'ospite. Infatti, la presenza di un materiale a base di MEC decellularizzata può essere notata dalle cellule del sistema immunitario dell'ospite, le quali reagiscono tramite il sistema di risposta immunitaria innata (Badylak, 2014). Questa risposta può giocare un ruolo positivo o negativo nel processo di rigenerazione. Numerosi studi, infatti, hanno sottolineato come il fattore che principalmente determina la riuscita o il fallimento della rigenerazione mediante biomateriale di origine biologica sia la risposta dell'ospite al materiale impiantato. Inoltre, tali studi hanno sottolineato che il processo di rigenerazione dipende da una risposta favorevole del sistema immunitario innato. Si deve, quindi, distinguere una risposta fisiopatologica innescata dal materiale che porta ad un risolversi costruttivo della rigenerazione (rigenerazione costruttiva), da una risposta proinfiammatoria indesiderata che porta alla formazione di tessuto fibroso nel sito di rigenerazione (rigenerazione proinfiammatoria) (Badylak, 2014).

Rigenerazione Costruttiva E Rigenerazione Proinfiammatoria

Il concetto di rigenerazione costruttiva di uno scaffold biologico si riferisce al processo nel quale un biomateriale degradabile viene completamente degradato e gradualmente sostituito da tessuto funzionale. Ciò avviene quando il biomateriale utilizzato è stato prodotto mediante metodi adeguati (decellularizzazione, eliminazione dei patogeni e residui cellulari). Dopo l'innesto, la risposta dell'organismo ospite consiste in un'immediata infiltrazione di neutrofili e, in minor misura, di macrofagi. Dopo ciò, durante i 4-7 giorni successivi all'innesto, segue una rapida infiltrazione di mononucleati, accompagnata da una rapida degradazione dello scaffold inserito e dal reclutamento di cellule endogene osteoprogenitrici. Una successiva modulazione della risposta immunitaria innata porta al culmine della fase di ricostruzione che consiste nella formazione di tessuto nuovo nel sito di interesse. Questa fase è anche accompagnata dallo spegnimento della reazione infiammatoria, che evita la perdita di funzionalità della zona e

l'instaurarsi di una risposta infiammatoria cronica (Badylak, 2014).

Il concetto di rigenerazione proinfiammatoria, invece, consiste nello sviluppo di un'infiammazione cronica. Questa si può manifestare quando i metodi di produzione del biomateriale hanno determinato una notevole alterazione della struttura nativa della MEC o nel caso di un utilizzo clinicamente inappropriato dello scaffold. Questo tipo di risposta può essere associata con un'effusione di siero ed eventualmente con la formazione di una cicatrice fibrosa densa a livello del tessuto. La situazione così delineata comporta un risvolto opposto rispetto allo stimolo costruttivo attuato dal sistema immunitario, infatti porta al deperimento, attorno al materiale, del microambiente adeguato, portando alla perdita dell'innesto con conseguente perdita di un adeguato contatto con il tessuto sano circostante opportunamente vascolarizzato ed innervato (Badylak, 2014). Si intuisce, quindi, che, sebbene la sicurezza e le proprietà meccaniche/funzionali del biomateriale siano molto importanti, l'elemento decisivo che determina il successo di un materiale è la sua interazione con il sistema immunitario dell'ospite e la reazione messa in atto nei suoi confronti dalla risposta immunitaria innata. Quello che si desidera avere, quindi, è un biomateriale capace di interagire con il sistema dell'ospite in modo non-distruttivo (Badylak, 2014).

L'innesto di biomateriale causa nell'organismo l'attivazione della risposta immunitaria innata, una risposta aspecifica e sempre presente nell'organismo. Essa coinvolge diverse tipologie cellulari, come macrofagi, monociti, neutrofili, cellule dendritiche, nonché cellule in grado di rilasciare mediatori dell'infiammazione, come basofili e mastociti. Come mediatori dell'infiammazione innata abbiamo anche cellule natural killer (NK) e proteine del complemento (Valentin et al., 2009). Nell'apprezzare la risposta dell'ospite alla presenza del biomateriale costituito da MEC, si è notato che i macrofagi rappresentano una componente chiave del sistema immunitario innato. Inoltre essi sembrano necessari al fine di ottenere un risultato costruttivo e funzionale dell'interazione biomateriale-tessuto (Valentin et al., 2009). I macrofagi sono dotati di notevole plasticità funzionale e giocano un ruolo importante sia nel processo di guarigione del tessuto sottoposto a innesto, sia nel processo rigenerativo, influenzando però sia in senso positivo che negativo (Badylak, 2014).

I macrofagi possono acquisire due diversi fenotipi a seconda degli stimoli che ricevono dal microambiente che li circonda: proinfiammatorio (fenotipo M1), con

funzioni di rilascio di citochine stimolanti la risposta infiammatoria, ed antiinfiammatorio (fenotipo M2) con funzioni regolatorie e costruttive. Il fenotipo M1 è indotto dall'interferone- γ (INF- γ), da solo o in combinazione con lipopolisaccaride (LPS) o TNF. Quando i macrofagi M1 sono attivati producono interleuchine (IL), IL-12, IL-6 e secernono citochine come IL-1 β , IL-6 e TNF. Il fenotipo M2 è indotto dall'esposizione dei macrofagi a vari segnali, incluse citochine quali IL-4, IL-3, e quando attivati producono alti livelli di scavenger ed IL-10.

Il loro meccanismo d'azione prevede che, una volta lasciato il torrente circolatorio, migrino verso il sito infiammato e qui vengano attivati in risposta al microambiente creatosi nel sito del tessuto danneggiato o in risposta a molecole di segnale rilasciate da elementi patogeni. In risposta a questa situazione, i macrofagi producono e rilasciano citochine ed altre molecole che sono capaci di richiamare ed attivare altre cellule infiammatorie dando avvio alla risposta infiammatoria (Valentin et al., 2009).

Infiammazione e MSC

Una possibilità per modulare la risposta immunitaria scatenata dall'innesto del biomateriale prevede l'utilizzo delle MSC. Sebbene le MSC siano state identificate negli anni '70 (Di Nicola et al., 2002), la loro capacità di modulare la risposta immunitaria è stata individuata una trentina di anni fa, in seguito a studi che hanno descritto la loro capacità di sopprimere la proliferazione delle cellule-T in vitro e prolungare la sopravvivenza di un innesto di pelle in vivo (Bartholomew et al., 2002). Da allora la comprensione di come le MSC medino i loro effetti immunosoppressivi ha fatto progressi, grazie anche a numerosi test in vitro che hanno offerto la possibilità di approfondire gli effetti delle MSC sulla risposta immunitaria innata ed adattativa (English, 2013). Le MSC hanno la capacità di interferire con molti elementi della risposta immunitaria innata, come macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili, mastociti e cellule NK (English, 2013). Riguardo alla risposta immunitaria adattativa sembra che le MSC possano direttamente inibire le funzioni delle cellule-T, mentre poco si sa riguardo agli effetti sulle cellule B, anche se alcuni studi propongono una capacità modulatoria delle funzioni e della proliferazione di queste. Inoltre, le MSC hanno dimostrato di esercitare degli effetti anti-infiammatori in vivo su encefalomieliti autoimmuni indotte, malattie

dell'apparato respiratorio e situazioni infiammatorie intestinali. Tuttavia, in vivo, i meccanismi attraverso i quali le MSC mediano i loro effetti immunosoppressori non sono ancora completamente compresi (English, 2013). I vari studi condotti fino ad ora hanno dimostrato che le MSC possiedono una forte azione immunosoppressiva sia in vivo che in vitro, ma recenti lavori hanno mostrato come tale capacità non sia innata ma venga espressa solo se opportunamente stimolate. Infatti le MSC acquistano tale capacità dopo essere state attivate da particolari fattori come INF- γ e TNF- α , IL-1 α o IL-1 β (Shi et al., 2010). Da questo si può comprendere l'influenza del microambiente sull'azione delle MSC e di come esse siano biochimicamente recettive. Questi stimoli esterni portano queste cellule, oltre ad essere attivate, ad attuare una strategia per risolvere l'infiammazione, incoraggiando la riparazione del tessuto (English, 2013).

Interessante è notare come le MSC, sia autologhe che allogene, allo svilupparsi di un sito infiammatorio, si localizzano preferenzialmente nel tessuto a livello del danno giocando un ruolo critico nella guarigione del tessuto infiammato (Shi et al., 2010). Queste cellule agiscono sia su danni causati da elementi patogeni sia su insulti causati da infiammazioni "sterili" (infiammazioni in assenza di microorganismi) (English, 2013). È ragionevole pensare che molti tessuti infiammati riescano a reclutare nel sito MSC, sebbene non ci siano delle evidenze della migrazione di queste cellule nel sito di interesse per via della mancanza di marcatori che permettano di seguire questi spostamenti (Shi et al., 2010). Attualmente, infatti, si conosce poco sulla capacità di migrazione delle MSC verso la zona del tessuto infiammato e in molti casi si è analizzata l'azione immunosoppressiva a distanza (Roddy et al., 2011). I segnali avvertiti dalle MSC, sia residenti nel sito che reclutate, tuttavia mettono in atto adeguate funzioni all'interno della cellula che le porta ad essere in grado di promuovere, a seconda della causa dell'infiammazione, o l'eliminazione del patogeno o la soppressione dell'infiammazione (English, 2013). Le MSC regolano il processo di risoluzione dell'infiammazione attraverso interazioni con molte cellule del sistema immunitario (macrofagi, neutrofili, cellule-T), ma al tempo stesso contribuiscono al processo ripartivo del sito danneggiato comunicando con fibroblasti, cellule endoteliali ed epiteliali (Shi et al., 2010).

Le interazioni delle MSC con fibroblasti e cellule endoteliali sono molto importanti poiché queste ultime sono le cellule più coinvolte durante il processo di

riparazione del tessuto danneggiato. Infatti, la risposta infiammatoria coinvolge anche il tessuto circostante al sito scatenante portando alla degradazione di MEC sana. I fibroblasti sono la maggiore fonte di MEC e contribuiscono alla rigenerazione della ferita mentre le cellule endoteliali controllano la velocità dell'angiogenesi (Meirelles Lda et al., 2009). La comunicazione tra queste tipologie cellulari e le MSC avviene grazie al rilascio da parte di quest'ultime di molti fattori di crescita come FGF, PDGF, TGF- β , VEGF ed Epidermal Growth Factor (EGF) (Meirelles Lda et al., 2009).

L'azione immunosoppressiva avviene mediante la comunicazione delle MSC con le cellule del sistema immunitario. Le MSC sembrano agire a livello dei macrofagi, che in risposta ai segnali di attivazione si possono trovare polarizzati nello stato M1 o M2. Su tali cellule sembra possibile ipotizzare una capacità, da parte delle MSC, di influenzare la loro polarizzazione. Alcuni studi, infatti, mostrano come queste cellule possano far diminuire la quantità di TNF- α , IL-1 α e IL-6 ed incrementare la produzione di IL-10 da parte dei macrofagi nonché aumentare l'attività fagocitaria di quest'ultimi (English, 2013). La capacità delle MSC di agire sui macrofagi sembra dovuta all'azione dell'Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) e della Prostaglandina E-2 (PGE-2) (English, 2013). L'espressione della IDO è indotta nelle MSC dalla stimolazione dell' INF- γ o grazie a ligandi che interagiscono con i recettori Toll-like Receptor (TLR) TLR3 e TLR4 presenti sulla membrana delle MSC. Questo legame attiva una protein-chinasi che a sua volta innesca un segnale a cascata che porta alla produzione di questo enzima. Oltre che ad avere effetto sulla polarizzazione dei macrofagi spingendoli verso il fenotipo M2 (Francois et al., 2012), l'IDO ha anche un diretto impatto sulla differenziazione delle cellule-T e sulla proliferazione delle NK (English, 2013).

La produzione di PGE-2 avviene ad opera della Cicloossigenasi 2 (COX2), enzima espresso costitutivamente nelle MSC. Questa prostaglandina viene espressa costitutivamente dalle MSC, ma la quantità rilasciata aumenta in risposta alla stimolazione da parte di INF- γ e TNF- α . La PGE-2 prodotta dalle MSC ha un ruolo importante nella riprogrammazione dei macrofagi da parte delle MSC (English, 2013). L'azione sulla polarizzazione dei macrofagi avviene grazie al legame con i recettori per le prostaglandine EP e più precisamente con EP2 ed EP4 presenti su queste cellule, con il conseguente aumento della produzione di IL-10 che facilita così la risoluzione dell'infiammazione (Nemeth et al., 2009). Inoltre, recenti studi

hanno dimostrato il ruolo della PGE-2 prodotta dalle MSC nella soppressione dell'attivazione e della proliferazione delle cellule-T sia in vivo che in vitro (English, 2013).

L'insieme dei fattori che inducono le capacità immunosoppressive nelle MSC e i fattori da esse rilasciati, oltre che le cellule interessate dall'azione di questi fattori, sono schematizzati in Figura 1.

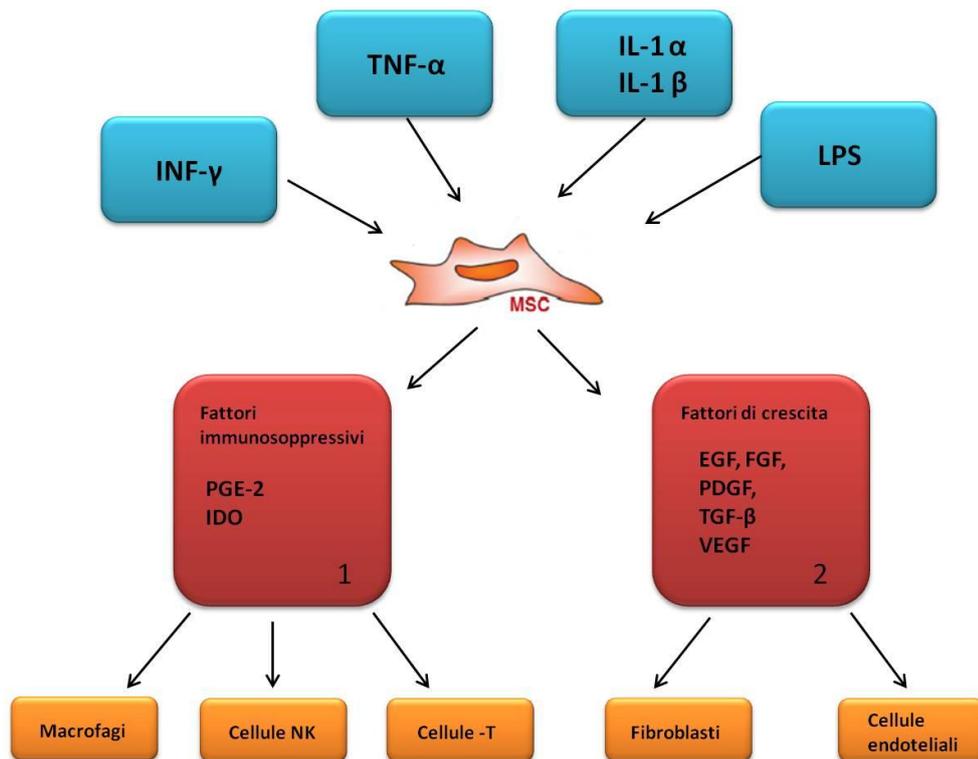


Figura 1: Attivazione delle MSC attraverso citochine e fattori proinfiammatori e successivo rilascio di: (1) fattori immunosoppressivi con azione sulle cellule immunitarie; (2) fattori di crescita con azione su cellule endoteliali e fibroblasti.

Grazie alle capacità immunosoppressive delle MSC nei confronti dei mediatori sia dell'infiammazione innata che dell'infiammazione adattativa è possibile risolvere il processo infiammatorio distruttivo che si può verificare in seguito all'innesto di biomateriale per la rigenerazione ossea. Inoltre, grazie all'interazione con i fibroblasti e le cellule endoteliali è possibile ricostruire il tessuto danneggiato durante il processo infiammatorio e ripristinare le condizioni ottimali per la rigenerazione ossea.

Ingegneria Dei Tessuti

Il termine “ingegneria dei tessuti” è stato coniato durante il workshop principale tenutosi in California nel febbraio del 1988 (Granlibakken Resort, Lake Tahoe) e nell’UCLA Symposium del 1992 (Tissue engineering. Selected papers from the UCLA Symposium of Tissue Engineering. Keystone, Colorado, April 6-12, 1990, 1991). La nuova disciplina è stata descritta in un articolo di Langer e Vacanti pubblicato su Science. Riportano: “L’ingegneria dei tessuti è un campo interdisciplinare, che vede l’applicazione dei principi e dei metodi dell’ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale” (Langer and Vacanti, 1993).

L’ingegneria dei tessuti è una nuova branca delle scienze biomediche, resa possibile dall’enorme progresso raggiunto nelle conoscenze del campo della biologia cellulare e delle biotecnologie, che ha consentito lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione e alla ricostruzione in vitro di tessuti ed organi. L’insieme di queste tecnologie rende possibile l’espansione ex vivo di cellule autologhe e il loro utilizzo nella riparazione di danni e nella rigenerazione di tessuti attraverso l’uso di matrici tridimensionalmente strutturate e biocompatibili. Modulando opportunamente le caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche di tali matrici è possibile utilizzarle come supporti per la semina, la crescita e il differenziamento di cellule autologhe al fine di rigenerare in vitro diversi tessuti specializzati.

L’ingegneria dei tessuti punta ad ottenere delle strutture funzionanti andando a sfruttare ed unire le potenzialità del trapianto di cellule viventi alla tecnologia degli organi artificiali. Si capisce che tale branca, introducendo l’uso di strutture bioartificiali, rappresenta un’evoluzione rispetto ai sostituti di prima generazione, come protesi ortopediche, valvole cardiache, per le quali si ricorre al trapianto da donatore.

La ricostruzione in vivo di un tessuto od organo necessita, però, di molte conoscenze, prima di tutto si deve conoscere in modo approfondito il tessuto/organo, le tipologie cellulari che lo compongono nonché i rapporti che intercorrono tra di esse. Per tal motivo si deve eseguire uno studio approfondito sulla composizione della matrice tridimensionale, sulle cellule e sulle vie di comunicazione che esse mettono in atto, sulle forze che agiscono sul tessuto stesso.

Inoltre, si richiede una conoscenza degli elementi chimici e dei meccanismi molecolari che regolano la crescita e il differenziamento cellulare.

Si può quindi affermare che l'ingegneria dei tessuti si basa su due componenti principali: il supporto tridimensionale e la componente biologica. Il supporto tridimensionale è rappresentato dai biomateriali, mentre la componente biologica comprende sia le cellule che i fattori molecolari.

Biomateriali

L'ingegneria dei tessuti si basa su due componenti principali: la componente biologica e un supporto tridimensionale. La componente biologica è composta dalle cellule e dai fattori molecolari, il supporto tridimensionale è composto dai biomateriali.

Per biomateriale s'intende "qualsiasi sostanza o materiale contenuto in sistemi terapeutici o diagnostici, ad esclusione di cibi e farmaci, in contatto con i fluidi biologici che si interfaccia con i sistemi biologici per valutare, trattare, aumentare o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo" (Tissue engineering. Selected papers from the UCLA Symposium of Tissue Engineering. Keystone, Colorado, April 6-12, 1990, 1991).

Il biomateriale rappresenta il supporto tridimensionale che consente alla cellula una distribuzione tridimensionale e la possibilità di deporre matrice extracellulare. Inoltre, il biomateriale utilizzato deve essere progettato e disegnato per facilitare il rendimento e la piena partecipazione delle cellule nei processi cellulari all'interno del tessuto (Orlando et al., 2011).

I biomateriali, per essere funzionali all'ingegneria tessutale, devono possedere tre caratteristiche principali:

1) Tollerabilità: devono essere immunologicamente inerti. Si deve considerare che un qualunque biomateriale provoca una risposta biologica nell'organismo in cui si trova ad operare, che a sua volta causa un processo di degradazione nel materiale stesso. Si parla, quindi, di una doppia interazione tra i due sistemi. Non bisogna commettere l'errore di considerare un biomateriale inerte nei confronti dell'organismo nel quale viene impiantato. L'organismo umano ha la possibilità di attivare numerosi e complessi meccanismi biologici che hanno funzione di difesa nei confronti di eventi ritenuti dannosi. Quindi, si capisce che un requisito fondamentale per un biomateriale è quello di non scatenare una risposta

indesiderata da parte dell'ospite. L'essere biocompatibile indica l'attitudine di un materiale ad essere ben tollerato dall'organismo ospite, determinando una risposta opportuna in relazione all'applicazione. Questa caratteristica si deve conservare per l'intera durata dell'applicazione a cui esso è destinato. Al fine di minimizzare e ridurre risposte negative, il biomateriale ideale deve possedere i seguenti requisiti:

- Proprietà di superfici costanti in condizioni operative al fine di evitare fenomeni di assorbimento;
- conservazione della composizione;
- buona emocompatibilità.

2) Biodegradabilità: requisito essenziale per l'utilizzo di un materiale ed è strettamente correlato con l'applicazione e la localizzazione del supporto biomedicale.

3) Il supporto deve rappresentare una impalcatura provvisoria: dopo l'integrazione il biomateriale deve essere sostituito dal tessuto originario;

4) Contenuto informativo: il biomateriale deve comunicare e scambiare segnali con le cellule dell'ospite (Caplan et al., 1998; Caplan, 2000a; b; 2002; Gotman, 1997; Lewandowska-Szumiel and Komender, 2000).

I biomateriali utilizzati nel campo dell'ingegneria dei tessuti devono possedere alcune altre caratteristiche:

- Biocompatibilità con il tessuto od organo ricevente;
- Biodegradabilità, è la velocità di degradazione del biomateriale che deve essere adeguata a quella di formazione del nuovo tessuto d'interesse;
- Atossicità, sia del materiale stesso sia di eventuali sostanze rilasciate nonché dei prodotti di degradazione dello stesso;
- Non immunogenicità;
- Proprietà meccaniche ottimali per inserirsi nel tessuto circostante;
- Porosità adatta e morfologia per il trasporto di cellule, gas, metaboliti, nutrienti e molecole sia all'interno del biomateriale sia tra il biomateriale e l'ambiente circostante.

Una delle principali proprietà richieste ai biomateriali è la biocompatibilità, ovvero la capacità di minimizzare le reazioni svantaggiose con i tessuti biologici. Attualmente nessun materiale è perfettamente inerte e le caratteristiche migliori da questo punto di vista le hanno gli ossidi ceramici refrattari.

Oltre a possedere le caratteristiche sopramenzionate, un biomateriale dovrebbe essere poco costoso, facile da maneggiare e ben adattabile alla superficie del tessuto con la quale deve venire a contatto (Duan et al., 2010).

I biomateriali possono essere suddivisi in base alla reazione provocata nell'organismo:

- biotossici: provocano reazione di rigetto,
- bioinerti: coesistono con il tessuto biologico circostante senza nessun cambiamento apprezzabile. Nessun dispositivo che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimoli un'incorporazione ed un riconoscimento può assicurare la stabilità delle sue prestazioni nel lungo periodo.
- bioriassorbibili: subiscono una progressiva dissoluzione all'interno del sistema biologico senza provocare reazioni di rigetto o effetti tossici (per esempio punti di sutura riassorbibili),
- bioattivi: favoriscono la formazione di legami con il tessuto biologico, al quale è consentita la libera crescita sulla superficie del materiale stesso. Devono interagire con le cellule, supportandone la crescita e la produzione dei componenti della matrice extracellulare, e con l'ambiente in cui vengono impiantati. Il biomateriale deve essere degradato, lasciando spazio alla crescita di altre strutture garantendo la piena integrazione.

In generale, i biomateriali vengono progettati e costruiti ispirandosi alla matrice extracellulare perché essa garantisce la comunicazione fra cellule e la stabilità dei tessuti tramite le molecole di adesione. La matrice extracellulare è composta da sostanza fondamentale, un gel molto idratato che conferisce alla matrice una resistenza alla compressione, da fibre che conferiscono resistenza alla trazione e da acqua che favorisce la rapida diffusione di sostanze.

Questi elementi, comuni a tutte le matrici extracellulari, si combinano in rapporti differenti in ciascun tessuto. Al fine di ottenere strutture tridimensionali compatibili con la matrice extracellulare del tessuto da rigenerare, vengono utilizzati biomateriali naturali, sintetici o semisintetici.

In base alla loro natura i biomateriali possono essere classificati in:

- naturali: collagene e collagene/GAG, materiali da cadavere, materiali animali, reticoli di fibronectina, acido ialuronico, cellulosa, alginati, idrossiapatite. I biomateriali naturali hanno diversi vantaggi come l'adesione selettiva (collagene e fibronectina), la biodegradabilità (gelatina e chitina) e hanno

proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti naturali (valvole cardiache di animali e vasi sanguigni). Gli svantaggi dei biomateriali naturali (comuni a quelli sintetici) sono rappresentati dal rischio di infezioni virali, antigenicità, materiale instabile e deterioramento nel tempo.

- sintetici: PGA, PLA, PTFE, ceramica, leghe, etc... Le matrici sintetiche sono reticoli di polimeri sintetici con un'architettura tridimensionale soddisfacente ma una biocompatibilità discutibile. Inoltre, la maggior parte dei biomateriali sintetici possiede uno scarso contenuto di informazioni e di segnali per le cellule.
- semisintetici: derivano da alterazioni dei biomateriali naturali allo scopo di migliorarne le prestazioni e sono acido ialuronico modificato, derivati dell'idrossiapatite, chitosano, acemananno.

Passando in rassegna le principali categorie di biomateriali, si può parlare di:

- biomateriali polimerici. Materiali quali i polimeri biodegradabili forniscono prestazioni per un periodo di tempo programmabile e poi si dissolvono nell'organismo. Fungono da supporti temporanei per guidare la crescita dei tessuti. Esempio di questi materiali sono i polimeri derivanti PGA o PLA.
- biomateriali metallici, quali per esempio il titanio e le sue leghe. Diverse caratteristiche lo rendono interessante: non è magnetico, possiede buone proprietà di trasmissione del calore, si passiva facilmente sviluppando resistenza agli acidi (il titanio e la sua lega sviluppano uno strato di ossidi superficiali: prevalentemente TiO_2), non è tossico ed ha buona biocompatibilità. Per le applicazioni biomediche la lega più utilizzata è quella Ti-6Al-4V. Il titanio puro possiede caratteristiche migliori rispetto a quelle esibite dalle sue leghe. In base al tipo di superficie del biomateriale si può dire che molti studi hanno dimostrato come l'adesione e la distribuzione degli osteoblasti procedano molto più rapidamente su superfici rugose piuttosto che su superfici lisce.
- biomateriali ceramici. Tra i bioceramici senza dubbio l'idrossiapatite possiede proprietà superiori e risulta assolutamente non tossica, non induce alcuna risposta infiammatoria o reazione da corpo estraneo. Tra gli svantaggi si annovera un basso valore del carico di rottura, una duttilità praticamente nulla e una difficoltà di manipolazione in sede chirurgica. Un metodo utile per superare tali svantaggi consiste nell'utilizzare materiali metallici ricoperti di

materiali bioceramici. I materiali bioceramici bioattivi, inoltre, vengono inclusi nei processi metabolici dell'organismo, si ha un adattamento della superficie al mezzo biologico e si ha un'integrazione a livello molecolare tra il materiale di impianto e il tessuto osseo, oppure si ha sostituzione del materiale riassorbibile con tessuto osseo sano.

- biomateriali compositi, quali vetroresina e plastiche rinforzate. Esempi di applicazioni biomediche sono: riempitivi per protesi odontoiatriche, protesi porose, particolati per protesi ortopediche, gomma per cateteri e guanti chirurgici.
- Sulla base della loro applicazione, i biomateriali possono essere suddivisi in supporti per la ricostruzione del tessuto molle o per la ricostruzione di tessuto duro (Bressan et al., 2011; Gardin et al., 2011).

Ultimamente appare sempre più chiaro come non sia sufficiente minimizzare le interazioni indesiderate tra tessuto e biomateriale, ma sia, invece, necessario promuovere interazioni specifiche a livello cellulare per rendere ottimali le condizioni per l'integrazione tra impianto e tessuto ricevente. Questo a seconda che interessi o meno che il materiale si integri con il tessuto ricevente (per esempio impianti dentali) oppure che rimanga bioinerte (come per esempio le viti da osteosintesi).

Tessuti molli

Allo stato attuale, le strategie per la ricostruzione del tessuto molle sono basate su innesti di tessuto autologo o su impianti di bioingegneria costituiti da cellule inoculate in supporti biocompatibili. Per questo scopo, vengono utilizzati diversi biomateriali naturali, anche in associazione con materiali sintetici o organici. Alcuni esempi di biomateriali utilizzati nella rigenerazione dei tessuti molli sono:

- Collagene: è la componente principale della matrice extracellulare del tessuto connettivo. Grazie alle sue biocompatibilità, resistenza e flessibilità, è ampiamente utilizzato per generare sostituti dermici. Diversi prodotti basati sul collagene sono attualmente commercializzati come sostituti dermici, in particolare sotto forma di idrogel. Questi sostituti sono solitamente ottenuti attraverso la sospensione di fibroblasti dermici in un idrogel di collagene. Tuttavia, il loro uso come innesto permanente è limitato a causa della loro bassa resistenza alla degradazione, soprattutto se l'idrogel è a bassa concentrazione

(Helary et al., 2011). Sono disponibili sul mercato anche sostituti dermici costituiti da uno strato di collagene associato a glicosaminoglicani dermici sovrapposti ad uno strato di silicone. Questi sostituti sono stati utilizzati con successo nel trattamento di ferite croniche (Kahn et al., 2011).

- Gelatina: è prodotta dall'idrolisi del collagene, ha alta capacità emostatica e non causa antigenicità. Grazie alle sue proprietà, la gelatina è stata ampiamente utilizzata come adesivo tissutale per la chiusura di ferite (Dhandayuthapani et al., 2010).
- Fibrina: deriva dalla polimerizzazione del fibrinogeno in presenza di trombina. Non fa parte della matrice extracellulare, ma è temporaneamente presente durante la guarigione delle ferite, in quanto è coinvolta nella coagulazione del sangue. Nel campo della medicina rigenerativa, la colla di fibrina è stata ampiamente utilizzata come adesivo tissutale. La colla di fibrina è commercializzata sotto forma di due soluzioni distinte: una di fibrinogeno e l'altra di trombina, applicabili mediante una doppia siringa o uno spray. Quando sono mescolati insieme, mimano le ultime fasi della cascata di coagulazione e formano un coagulo di fibrina (Thompson et al., 1988). La colla di fibrina è stata utilizzata, in alternativa alle clip, in pazienti ustionati sottoposti all'innesto di pelle. Essa ha dimostrato di essere sicura ed efficace, dando risultati migliori del clippaggio. Inoltre, l'uso di colla di fibrina ha ottenuto la compliance dei pazienti, dal momento che la rimozione delle clip è spesso dolorosa e richiede più tempo (Foster et al., 2008).
- Acido ialuronico: è un polisaccaride della matrice extracellulare diffuso in modo ubiquitario. In un ambiente acquoso, genera matrici viscosi che garantiscono l'idratazione dei tessuti, regola l'organizzazione di matrice di proteoglicani, ed è anche coinvolto nell'adesione, nella proliferazione, nella migrazione e nella differenziazione cellulare. Studi in vitro e in vivo hanno ampiamente dimostrato le sue potenzialità nella costruzione di supporti tridimensionali particolarmente utili per l'ingegneria tissutale (Solchaga et al., 1999). I derivati dell'acido ialuronico sono disponibili sul mercato, come l'HYAFF® 11 (Fidia, Italia), un derivato lineare dell'acido ialuronico modificato dalla completa esterificazione dei gruppi carbossilici dell'acido glucuronico con gruppi benzili. Questa modifica determina una bassa idrofilia e la degradazione da parte delle ialuronidasi. I derivati esterificati mantengono le stesse caratteristiche

biologiche come l'acido ialuronico, ma hanno un tempo di permanenza più lungo quando vengono impiantati e possono essere trattati mediante varie tecniche di tessitura, permettendo, inoltre, la produzione di vari articoli quali garze, spugne, microsfele, granuli e membrane, con caratteristiche che possono essere adattate a molte applicazioni cliniche (Campoccia et al., 1998).

- Laminina: è una glicoproteina della matrice extracellulare generalmente presente nella membrana basale. Promuove l'adesione, la migrazione, la crescita e la differenziazione cellulare. Nel campo dell'ingegneria tissutale, la laminina è utilizzata per migliorare le funzionalità di supporti tridimensionali e per prevenire o minimizzare il rigetto del trapianto. È stato dimostrato che l'associazione della laminina con un supporto a base di chitina (un elemento strutturale dell'esoscheletro dei crostacei) favorisce la guarigione delle ferite velocizzando la repitelizzazione attraverso la riduzione degli infiltrati infiammatori e la maggiore proliferazione di fibroblasti (Min et al., 2010)

Tessuti duri

In generale, parlando della ricostruzione del tessuto duro, si intende la rigenerazione del tessuto duro per eccellenza: il tessuto osseo. Attualmente, i progressi nel campo delle nanotecnologie hanno permesso di produrre sostituti ossei alternativi al trapianto di tessuti ossei derivanti dallo stesso paziente (autotrapianto) o da donatori (allograpianto). Oggi l'autotrapianto è ancora il "gold standard" nella ricostruzione ossea in quanto dispone di alcune qualità importanti:

- Osteoconduttività: assicura l'adesione e la proliferazione cellulare in una struttura che permette la migrazione cellulare e la formazione di nuovi vasi;
- Osteogenicità: assicura la presenza degli osteoblasti nella sede di adesione dell'innesto per favorire la generazione di nuovo tessuto osseo;
- Osteoinduttività: è la capacità di stimolare le cellule osteoprogenitrici a differenziarsi in osteoblasti. Nonostante queste caratteristiche, l'autotrapianto è associato a diversi effetti collaterali, tra i quali: dolore post-operatorio, formazione di ematomi, emorragie, lesioni dei nervi, infezioni e difetti estetici. L'allograpianto, invece, comporta un elevato rischio di trasmissione di malattie e di risposte immunitarie; per questo motivo, gli innesti ossei, prima di essere impiantati, vengono congelati o liofilizzati. Un'alternativa per l'allograpianto è la matrice ossea demineralizzata, prodotta dall'osso corticale decalcificato

trattato con agenti chimici e radiazioni. Il risultato, una matrice ossea costituita solamente da proteine denaturate, non è una struttura stabile ma un substrato osteoconduttivo da utilizzare in caso di lesioni ossee strutturalmente stabili. Anche se esistono diverse forme di trapianti ossei, tutti condividono una ridotta osteoinduttività e l'assenza di una componente cellulare, come gli innesti da donatori vengono devitalizzati mediante radiazioni o liofilizzazione (Finkemeier, 2002). Un modo per aggirare gli inconvenienti relativi al trapianto di tessuto osseo è quello di trattare i difetti ossei con sostituti di bioingegneria. Oltre alle caratteristiche già citate di osteoconduttività, osteogenicità e osteoinduttività, il sostituto osseo ideale deve possedere altre caratteristiche precise (Gardin et al., 2012b):

- Osteointegrazione: la capacità di stabilire connessioni con il tessuto osseo originale;
- Biodegradabilità;
- Morfologia simile all'osso umano;
- Utilizzo clinico semplice;
- Economico.

Un gran numero di sostituti ossei, di origine naturale e sintetica, che promuovono la proliferazione, la differenziazione e la migrazione delle cellule, sono disponibili sul mercato. Tra questi ci sono biomateriali a base di:

- Metalli: sono stati ampiamente utilizzati, in particolare il titanio, come sostituti ossei, grazie alla loro resistenza meccanica. Tuttavia, dopo 10-15 anni gli impianti metallici devono essere sostituiti a causa della loro scarsa o incompleta osteointegrazione con l'osso circostante. Al fine di migliorare l'osteointegrazione, sono stati sviluppati impianti metallici con superfici nanostrutturate che aumentano la loro rugosità superficiale e la loro bagnabilità, favorendo l'assorbimento di proteine, l'adesione e la proliferazione cellulare e la deposizione di calcio (Tran and Webster, 2009).
- Ceramica: formati da fosfato di calcio, come idrossiapatite (HA) e β -fosfato tricalcico (TCP), sono ampiamente utilizzati nella rigenerazione del tessuto osseo con grazie alla loro elevata biocompatibilità con le cellule e il tessuto osseo. I ceramici sono anche bioattivi, vale a dire, sono in grado di supportare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Sebbene HA e TCP assomiglino ai componenti inorganici della matrice ossea, il loro impiego è

limitato dalla loro fragilità e dalla bassa resistenza alla pressione. Inoltre, come i metalli, anche i ceramici hanno una scarsa osteointegrazione, che può essere modificata tramite lo sviluppo di superfici su scala nanometrica. Rispetto alle ceramiche convenzionali, le ceramiche in scala nanometrica sono caratterizzate da una maggiore adesione e proliferazione cellulare e da depositi di calcio grazie alla maggiore bagnabilità e all'assorbimento di vitronectina, una delle proteine coinvolte nella adesione cellulare (Webster et al., 2001).

- Polimeri: di origine naturale o sintetica. I polimeri naturali includono polisaccaridi (alginato, chitina/chitosano, acido ialuronico e derivati) e proteine (collagene, fibrina e seta). Il vantaggio di polimeri naturali risiede nella loro elevata biocompatibilità, ma i polimeri sintetici non hanno immunogenicità e possono essere elaborati per ottenere particolari caratteristiche (Balasundaram and Webster, 2007). I polimeri sintetici più usati sono l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e i loro copolimeri, e l'acido glicolico polilattico (PLGA). L'osteointegrazione dei polimeri, inoltre, può essere aumentata se vengono modificati a livello nanometrico, per esempio, attraverso il legame con le proteine o i peptidi che possono aumentare l'adesione cellulare. Poiché l'attività biologica delle proteine di adesione si esprime attraverso particolari sequenze RGD (arginina-glicina-aspartato), la funzionalizzazione di polimeri sintetici con tali sequenze aumenta la loro interazione con le integrine, i recettori di membrana delle sequenze RGD, favorendo l'adesione cellulare (Paletta et al., 2010). Poiché i sostituti ossei sono costituiti da un solo componente, non hanno tutte le caratteristiche di un sostituto ideale, perciò la ricerca negli ultimi anni si è concentrata sulla combinazione dei materiali sopra elencati.

Cellule Staminali

Si definisce cellula staminale, una cellula che può dividersi continuamente generando cellule figlie indifferenziate (self-renewing) o cellule specializzate (multilineage differentiation). Infatti, possono dividersi simmetricamente, per aumentare il numero di cellule staminali, oppure asimmetricamente, per mantenere inalterato il numero di cellule staminali e generare cellule progenitrici che a loro volta daranno origine a cellule mature (Bluteau et al., 2008). Le cellule

staminali si dividono in Cellule Staminali Embrionali (ESC) e Cellule Staminali Adulte (ASC). Le ESC derivano dalla massa interna della blastocisti di un embrione di pochi giorni, mentre le ASC risiedono in diversi organi e tessuti dell'individuo adulto. La sede di queste ASC sono dei microambienti, denominati "nicchie di staminalità", composti da tipi eterogenei di cellule, MEC e fattori solubili che supportano il mantenimento e l'auto-rinnovamento delle cellule staminali che vi risiedono (Bluteau et al., 2008). Le ESC sono definite cellule staminali pluripotenti poiché sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari che costituiscono l'individuo adulto, mentre le ASC sono definite cellule staminali multipotenti, in quanto il loro potenziale di differenziazione è limitato a particolari tipi cellulari (Yen and Sharpe, 2008). Per questo motivo, le ASC sono anche denominate cellule staminali post-natali o somatiche. Le ASC non possono essere identificate con certezza, ma solo sulla base di proprietà indirette, come l'espressione di un particolare insieme di marcatori di superficie, il lento ciclo cellulare, la clonogenicità e lo stato indifferenziato. Il modo migliore per determinare la "staminalità" è la valutazione del self-renewal che si basa sull'isolamento di presunte cellule staminali e il loro successivo trapianto per poter valutare la loro capacità di ricostruire il tessuto ospite (Bluteau et al., 2008).

Cellule Staminali Mesenchimali

Le Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) sono ASC non-ematopoietiche di origine mesodermica e neuroectodermica. Possono essere individuate ed isolate in molti tessuti: midollo osseo, tessuto adiposo e polpa dentale. Le MSC possiedono una grande capacità di auto rinnovamento e possono differenziarsi in cellule di natura mesodermica come condrociti, adipociti ed osteociti (Bluteau et al., 2008). Sembra che la loro funzione nel corpo umano sia di garantire un serbatoio di cellule riparative senza particolari caratteristiche ma recettive a segnali che possano guidarle a differenziarsi in linee cellulari specializzate. Il destino delle MSC può essere influenzato da segnali di diversa natura: da danni tissutali quali traumi, fratture, infiammazione, necrosi e tumori, da segnali chemotattici e da segnali provenienti dal microambiente circostante (Pountos and Giannoudis, 2005).

Le MSC sono sempre cellule staminali multipotenti e possiedono alcune qualità: prima di tutto quella di non generare problemi etici nel loro utilizzo e poi la possibilità di essere amplificate in laboratorio in condizioni di coltura standard.

Inoltre, si deve anche ricordare che godono di un grado di plasticità maggiore rispetto alle altre ASC, cioè sono in grado di differenziarsi in vitro in popolazioni cellulari non di origine mesodermica. Queste caratteristiche, capacità proliferativa in vitro, multipotenza ed elevato potenziale di differenziazione, hanno reso le MSC interessanti per l'utilizzo nella rigenerazione tissutale (Pountos and Giannoudis, 2005). Le MSC sono state individuate e caratterizzate per la prima volta nello stroma del midollo osseo da Friedenstein e collaboratori, che considerarono questa fonte come quella più accessibile e ricca di cellule staminali (Friedenstein et al., 1970). Possono essere amplificate notevolmente in vitro e impiegate in terapie cellula-mediate e in tecniche di ingegneria tissutale. Tuttavia l'utilizzo delle MSC da midollo osseo è limitato da diversi problemi, tra cui il prelievo doloroso spesso associato ad una scarsa quantità di cellule. Per queste ragioni, molti ricercatori hanno iniziato a cercare fonti alternative più accessibili e abbondanti da cui ricavare MSC con procedure di raccolta meno invasive. Successivi studi hanno messo in luce la presenza e la possibilità di isolamento delle MSC in altri tessuti come cartilagine, periostio, tessuto adiposo, muscoli e tendini (Pountos and Giannoudis, 2005).

Il tessuto adiposo, come il midollo osseo, ha origine mesodermica e contiene uno stroma di supporto facilmente isolabile (Zuk et al., 2002). Esso può considerarsi un'ottima fonte di MSC, in quanto è un tessuto ubiquitariamente distribuito nell'organismo e di facile accesso tramite interventi poco dolorosi e in anestesia locale, nonché ottenibile in grandi quantità, ottenendo Cellule Staminali da tessuto Adiposo (ADSC) (Zavan et al., 2010). Questa popolazione cellulare può essere isolata in quantità rilevanti dal tessuto adiposo e dimostra, in vitro, una cinetica di proliferazione stabile (Zuk et al., 2002).

La loro elevata capacità di proliferare insieme alla loro multipotenzialità e il loro potenziale di differenziazione elevata rendono le MSC candidate interessanti per la rigenerazione dei tessuti. Cellule MSC sono stati scoperte e caratterizzate prima nello stroma del midollo osseo e denominate derivate dal midollo osseo staminali mesenchimali (BMMSC) (Friedenstein et al., 1970). Esse possono essere facilmente ottenute amplificandole in vitro e possono essere utilizzate per l'ingegneria tissutale.

Cellule staminali derivate dal tessuto adiposo

Il tessuto adiposo, come il midollo osseo, deriva dal mesenchima ed è caratterizzato da un supporto stromale facile da isolare. Il tessuto adiposo quando siano da isolare le cellule staminali rappresenta una fonte alternativa al midollo osseo. Attraverso operazioni di liposuzione è possibile raccogliere una grande quantità di cellule staminali adipose (ADSC) che possono essere facilmente amplificate in vitro. Infatti, in condizioni di coltivazione normali e senza particolare attenzione le ADSC crescono rapidamente mostrando una stabile cinetica di proliferazione (Zuk et al., 2002). È stato dimostrato che le ADSC, come le BMMSC, possono differenziare in vitro in osteociti, adipociti, miociti e condrociti, se trattate con specifici fattori di differenziazione. Tale plasticità è un'ulteriore conferma che il tessuto adiposo è composto da una popolazione di cellule staminali multipotenti con capacità differenziative uguali alle BMMSC.

La "staminalità" delle ADSC è stata confermata dalla caratterizzazione di marcatori antigene CD (cluster di differenziazione). Analogamente alle BMMSC, le ADSC esprimono i marcatori sulla superficie cellulare: CD29, CD44, CD71, CD90, CD105 / SH2 e SH3, che insieme con SH2, è considerato un marker per MSC (Haynesworth et al., 1992).

Oltre a questi marcatori, le ADSC e BMMSC esprimono STRO-1, un indicatore utilizzato per isolare le cellule madri del midollo osseo (Dennis et al., 2002). Al contrario, le ADSC non esprimono i marcatori del lignaggio emopoietico CD31, CD34 e CD45. Inoltre sono positivi per CD13, ma negativi per CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104 e CD106. Le ADSC differiscono dalle BMMSC solo per l'espressione di due marcatori antigene: CD49d e CD106. In particolare, le ADSC esprimono CD49d ma non CD106, mentre il contrario è stato osservato nelle BMMSC (Zuk et al., 2002). L'espressione di CD106 è funzionalmente associata all'ematopoiesi (Levesque et al., 2001), di conseguenza, la mancanza di espressione di questo marcatore antigene ADSC è coerente con la loro localizzazione in un tessuto non-ematopoietico.

Poiché il tessuto adiposo - proprio come lo stroma del midollo osseo - deriva dal mesoderma, non è improbabile osservare la differenziazione delle ADSC nelle cellule della linea mesodermica. Tuttavia, è stata documentata la loro differenziazione in cellule del fenotipo neuronale, generando cellule con morfologia simile ed espressione di marcatori proteici simili alle cellule nervose

(Franco Lambert et al., 2009).

Si è concluso che le ADSC possiedono tutte le caratteristiche tipiche delle MSC: morfologia fibroblastoide, capacità di formare colonie isolate denominate CFU-F (unità formanti colonie fibroblastoide), espressione del tipico insieme di marcatori di superficie cellulare, multipotenza, ovvero la capacità di differenziarsi in cellule della linea mesodermica (Kern et al., 2006).

Cellule staminali della polpa dentale

La polpa dentale è un tessuto connettivo molle di origine mesenchimale collocato all'interno della cavità pulpare del dente. E' possibile identificare quattro diversi strati nella polpa: lo strato più esterno costituito da odontoblasti che generano la dentina; un secondo livello chiamato "zona acellulare", povero di cellule, ma ricca di fibre di collagene; un terzo strato chiamato "zona ricca di cellule", contenente le cellule progenitrici e le cellule indifferenziate, alcune delle quali sono cellule staminali; uno strato più interno, situato nel centro della camera pulpare, ricco di reti di vasi e di nervi. Le cellule staminali e le cellule indifferenziate contenute nella "zona ricca di cellule" possono migrare in diverse aree, dove - guidate da stimoli diversi - possono dare origine a nuove cellule differenziate e a tessuti specializzati (d'Aquino et al., 2007). La polpa dentale del terzo molare, anche se spesso non considerata, rappresenta una fonte facilmente accessibile di MSC. Fu solo nel 2000 che le cellule staminali della polpa dentale (DPSC) sono state identificate ed isolate secondo le loro capacità clonogeniche e la loro elevata velocità di proliferazione. (Gronthos et al., 2000). In seguito, sono state identificate più di quattro tipi di cellule MSC derivate dalla polpa dentale: le cellule staminali sfaldate dei denti decidui umani (SHED) (Miura et al., 2003), le cellule staminali derivate dai legamenti parodontali (PDLSC) (Seo et al., 2004), le cellule staminali dalle papille apicali (SCAP) (Sonoyama et al., 2006) e le cellule progenitrici del follicolo dentale (DFPC) (Morsczech et al., 2005). Tutte mostrano multipotenzialità e capacità di rigenerare diversi tessuti dentali e parodontali in vitro e in vivo (Huang, 2009).

Inoltre, sono positive per i marcatori STRO-1, CD13, CD24, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, Oct 4, Nanog e $\beta 2$ integrina, ma negative per CD14, CD34, CD45 e HLA-DR. La persistenza della negatività per CD45 e della positività per CD34 dimostra che le DPSC non sono derivate da una fonte ematopoietica, ma sono di origine mesenchimale (d'Aquino et al., 2007). Proprio come tutte le MSC, le

DPSC sono una popolazione eterogenea e i diversi indicatori di cui sopra possono essere espressi in sottopopolazioni delle stesse cellule (Huang, 2009).

Possono sopravvivere in coltura per lunghi periodi ed essere mantenute per diversi passaggi: chiari segni di senescenza non sono stati rilevati fino ad 80 passaggi. Inoltre, possono essere crioconservate per lunghi periodi senza perdere il loro multipotenzialità (Laino et al., 2005).

È stata dimostrata la loro differenziazione in odontoblasti, le cellule che producono la matrice mineralizzata della dentina (Gronthos et al., 2000). Tuttavia, le DPSC possono anche differenziarsi in adipociti e neuroni, mostrando la morfologia e rispettivi marcatori. Inoltre, è stata osservata la loro differenziazione condrogenica e miogenica in vitro. La plasticità e la multipotenzialità delle DPSC possono essere collegate alle origini della polpa dentale, composta da componenti sia ectodermici che mesodermici e dalle cellule della cresta neurale derivata. (d'Aquino et al., 2007).

Applicazioni di terapia cellulare per la rigenerazione craniofacciale

L'interesse sulle nuove terapie a base di cellule staminali è aumentato in modo esponenziale negli ultimi anni, non solo nella comunità scientifica, ma anche all'interno della società. Infatti, le cellule staminali sembrano essere la migliore possibilità per l'ingegneria dei tessuti umani, e in particolare, le cellule staminali mesenchimali (MSC) rappresentano un ottimo strumento nella medicina rigenerativa a causa della loro capacità di differenziarsi in una varietà di cellule specializzate, in aggiunta alle loro caratteristiche immunomodulatorie.

Tuttavia sia le cellule somatiche che le cellule staminali possono essere utilizzate in terapia cellulare. Le cellule somatiche possono essere raccolte, coltivate e impiantate con l'obiettivo di generare nuovi tessuti. Le limitazioni nel loro utilizzo sono legate alla mancanza di capacità di auto-rinnovamento e di potenza limitata; tali caratteristiche sono esclusive delle cellule staminali (Garcia-Godoy and Murray, 2006). L'utilizzo di cellule somatiche e la terapia con cellule staminali sono state valutate in diverse aree della medicina rigenerativa.

Le cellule somatiche nella regione cranio-facciale, le cellule simili ai fibroblasti derivate dal legamento parodontale sono state utilizzate per promuovere la rigenerazione parodontale (Dogan et al., 2002; 2003). Come dimostrato attraverso studi in vivo, le cellule parodontali di origine orale sono in grado di stimolare la

formazione di osso alveolare (Lekic et al., 2001). I cementoblasti, i fibroblasti del legamento parodontale, e le cellule del follicolo dentale, impiantate su scaffold tridimensionali in acido polilattico-co-glicolico, mostrano formazioni minerali in vitro (Jin et al., 2003b). I cementoblasti associati a grandi difetti parodontali attraverso spugne biodegradabili in polimero PLGA hanno contribuito a completare la mineralizzazione dell'osso e la formazione di legamento parodontale, mentre le cellule del follicolo dentale hanno inibito la formazione di osso (Zhao et al., 2004).

Un altro studio ha dimostrato che i fibroblasti cutanei, trasdotti dal gene BMP-7, hanno promosso la rigenerazione dei difetti parodontali, tra cui osso nuovo, legamento parodontale funzionale e cemento della radice del dente (Jin et al., 2003a). Nella gestione dei difetti dei tessuti molli sono stati utilizzati anche fibroblasti coltivati per il trattamento dell'insufficienza interdentale papillare (McGuire and Scheyer, 2007). Un equivalente della mucosa orale umana, fatta di cheratinociti autologhi su un supporto dermico da cadavere (AlloDerm®), era maggiormente in grado di favorire la guarigione delle ferite rispetto al solo vettore dermico (Izumi et al., 2003). Un equivalente della mucosa orale sintetizzato ex vivo (EVPOME), prodotto senza l'utilizzo di siero di origine animale. (Hotta et al., 2007), ha dimostrato la sua capacità di promuovere l'inizio precoce dell'epitelizzazione, un periodo di guarigione breve e una minima contrazione cicatriziale. Questo può essere in parte spiegato con la capacità di questo costrutto vivente a secernere fattori di crescita come VEGF, promuovendo la vascolarizzazione iniziale, che è fondamentale per la sopravvivenza del successivo trapianto (Nakanishi et al., 2007; Xu et al., 2009). L'EVPOME è stato utilizzato con successo per il trattamento di pazienti affetti da carcinoma della lingua a cellule squamose, leucoplachia della lingua, gengiva e mucosa buccale o ipoplasia della cresta alveolare (Hotta et al., 2007). In altre applicazioni dei tessuti molli, i fibroblasti allogenic del prepuzio sono stati utilizzati per promuovere la formazione di tessuto cheratinizzato in difetti mucogengivali (McGuire and Nunn, 2005). Un costrutto cellulare vivente tissutale composto da cheratinociti e fibroblasti neonatali vitali ha mostrato simili risultati clinici rispetto agli impianti autologhi gengivali convenzionali (McGuire et al., 2011). Questo costrutto ha un forte potenziale di promuovere la neogenesi del tessuto attraverso la stimolazione di segnali angiogenici (Morelli et al., 2011). Un altro prodotto interessante consiste nell'applicazione di cheratinociti e fibroblasti

neonatali per aumentare la gengiva cheratinizzata attorno ai denti (McGuire et al., 2008). Questo costrutto di cellule può stimolare l'espressione di biomarcatori dell'angiogenesi rispetto agli innesti autogeni gengivali liberi durante le prime fasi della cicatrizzazione (Morelli et al., 2011) e, di conseguenza, costituisce un materiale promettente per l'innesto gengivale senza la necessità di un sito donatore.

I vantaggi dell'utilizzo di cellule somatiche per la rigenerazione dei tessuti duri e molli nel distretto cranio-facciale sono stati illustrati da numerosi studi preclinici e clinici (Mao et al., 2006). Sebbene la mancanza di capacità di auto-rinnovamento e il loro impegno verso un unico fenotipo cellulare limitano il loro uso nel trattamento dei difetti cranio-facciali più impegnativi, in cui una risposta cellulare più orchestrata potrebbe essere fondamentale per ottenere il successo. Date le loro caratteristiche più rilevanti, le cellule staminali potrebbero avere un maggiore potenziale in questo settore.

Scaffold per terapia cellulare in difetti orali e craniofaciali

Come sottolineato in precedenza, gli scaffold giocano un ruolo fondamentale nel fornire un modello tridimensionale per la neogenesi tissutale [Mao 2008]. Gli scaffold possono essere utilizzati non solo come vettori per la consegna delle cellule, ma possono anche servire come ambienti sintetici della matrice extracellulare per definire una geometria 3D per la rigenerazione dei tessuti e forniscono un microambiente adeguato in termini di composizione chimica, struttura fisica e strutture biologicamente funzionali (Liu and Ma, 2004; Rice et al., 2005).

Finora, gli scaffold più ampiamente adottati per la rigenerazione ossea craniofacciale sono sostituti ossei xenogenici e allogenici, idrossiapatite, fosfati di calcio, e gelatina o spugne di collagene (Kaigler et al., 2010; Kawaguchi et al., 2004; Lekic et al., 2001; Nakahara et al., 2004). Le limitazioni nel loro utilizzo sono legate alla mancanza di degradabilità di determinati materiali o alla degradabilità troppo rapida di altri, alla scarsa lavorabilità in strutture porose, alla fragilità, all'incapacità di generare strutture che possono essere adattate alle esigenze specifiche del paziente, o all'incapacità di mantenere il volume desiderato sotto stimoli meccanici. Per superare queste limitazioni, sono in corso di valutazione degli scaffold sintetici appositamente progettati per imitare la guarigione delle

ferite della matrice extracellulare.

Questo concetto biomimetico, applicato alla sintesi di materiali, intende generare scaffold biodegradabili con una struttura altamente porosa e di adeguate proprietà meccaniche per l'ingegneria del tessuto osseo (Ma, 2008). Idealmente, un materiale per gli scaffold deve essere degradabile ad un tasso simile a quello della nuova formazione di tessuto, sono necessari grandi pori interconnessi per consentire la costituzione, la migrazione e la proliferazione delle cellule (Zhang and Ma, 2000). La formazione delle ossa avviene su una matrice strutturata di collagene con diametro del fascio di fibre variabile da 50 a 500 nm (Elsdale and Bard, 1972), quindi scaffold di nanofibre sembrano fornire una migliore adesione cellulare (Woo et al., 2003), una maggiore differenziazione delle cellule osteoblastiche (Chen et al., 2006), e una maggiore deposizione di minerali rispetto agli scaffold con pareti solide (Woo et al., 2007). L'electrospinning, l'auto-assemblaggio e la separazione di fase sono i tre diversi metodi utilizzati per la realizzazione di scaffold polimerici nano-fibrosi per l'ingegneria tissutale. L'electrospinning è un metodo semplice, che utilizza un campo elettrico per creare una soluzione polimerica da un orifizio ad un collettore, producendo fibre polimeriche (Dosunmu et al., 2006; Jia et al., 2002). Può essere usato per produrre sottili fogli bidimensionali, mentre scaffold di nanofibre tridimensionali sono stati realizzati sovrapponendo questi fogli 2D (Matthews et al., 2002) o combinando l'elettrofilatura con la stampa 3D (Moroni et al., 2008). L'autoassemblaggio molecolare, per la realizzazione di architetture supramolecolari, utilizza legami non covalenti, come legami idrogeno, interazioni di van der Waals, interazioni elettrostatiche e interazioni idrofobiche (Whitesides et al., 1991). Le limitazioni nell'uso di metodi di auto-assemblaggio sono legate alla difficoltà di creare macropori e alle limitate proprietà meccaniche (Smith et al., 2009). Infine, la tecnica di separazione di fase indotta termicamente (TIPS) può essere usata per fabbricare nano-fibre attraverso la dissoluzione del polimero, la separazione di fase e la gelificazione, l'estrazione con solvente, il congelamento e la liofilizzazione sottovuoto (Ma and Zhang, 1999). Questa tecnica può anche essere combinata con tecniche di lavorazione, come il leaching di particolato o la stampa 3D per la progettazione di strutture 3D complesse con morfologie ben definite dei pori (Chen et al., 2006; Wei and Ma, 2006). Un altro aspetto interessante degli scaffold polimerici è che le tecnologie CAD/CAM possono essere applicate per creare

scaffold di forma anatomica paziente-specifici. Poichè i difetti cranio-facciali e le strutture anatomiche possono variare notevolmente tra i diversi individui, uno scaffold unico per ogni paziente può essere utile nella rigenerazione dei difetti con geometria complessa (Ma, 2008). I polimeri hanno una grande flessibilità progettuale e la loro composizione e la loro struttura possono essere progettate per soddisfare le esigenze specifiche del tessuto che deve essere lavorato. Inoltre, maggiori benefici possono essere raggiunti con l'aggiunta di idrossiapatite nanocristallina negli scaffold, in quanto ha un forte potenziale di attrazione degli osteoblasti (osteococonduttività), migliora le proprietà meccaniche (Wei and Ma, 2004), e può ridurre gli effetti avversi associati alla degradazione di alcuni polimeri sintetici (Smith et al., 2009). I cristalli di idrossiapatite possono essere incorporati durante l'elaborazione degli scaffold polimerici o potrebbero essere coltivati su uno scaffold polimerico prefabbricato. Poiché tutte le interazioni con i componenti biologici avvengono sulla superficie dei pori, la ceramica non esposta è in effetti non utilizzata (Smith et al., 2009) e potrebbe influenzare la biodegradabilità e le proprietà meccaniche dello scaffold. Si raccomanda pertanto di consentire all'apatite di formare un rivestimento dello scaffold polimerico, al fine di migliorare le caratteristiche della superficie. E' stata descritta un'interessante tecnologia in cui lo scaffold in polimero prefabbricato è imbevuto di fluidi corporei artificiali al fine di consentire cristalli di apatite di crescere sulle superfici dei pori (Boskey, 1998; 2003).

I fattori di crescita possono essere facilmente incorporati negli scaffold polimerici (Elisseff et al., 2001; Jin et al., 2008; Wei et al., 2007), e ciò consentirebbe un rilascio maggiore delle molecole ed una migliore formazione di tessuto orchestrata correttamente. Perciò, gli scaffold in nanofibre 3D porosi hanno sostenuto varie cellule staminali e cellule differenziate per rigenerare molti tessuti duri e molli.

Scopo della tesi

La condizione di edentulia parziale o totale e le conseguenze correlate, rappresentano oggi un problema importante in campo odontoiatrico. La sostituzione dei denti mediante impianto dentale, una delle terapie più popolari per edentulia totale o parziale, tuttavia, non è sempre una soluzione possibile.

L'estrema atrofia o la perdita di tessuto osseo necessitano di ricostruzione, prima di inserire l'impianto. I tessuti autologhi sono stati ampiamente utilizzati e sono ancora considerati come il gold standard. Tuttavia, anche le tecniche ricostruttive più avanzate che usano materiali autologhi sono spesso insufficienti a ripristinare estesi o complessi difetti maxillo-facciali.

L'uso di tessuto autologo comporta la necessità di prelievo da un sito donatore, con i conseguenti svantaggi in termini di costi, tempi di procedura, discomfort del paziente e possibili complicanze. Per questo sono state sviluppate altre categorie di sostituti ossei.

Gli scopi del presente lavoro di tesi sono di valutare:

- le caratteristiche di un prelievo di osso autologo;
- se l'ingegneria dei tessuti, attraverso l'uso di biomateriali e cellule staminali, può essere una terapia efficace per la rigenerazione ossea in ambito odontoiatrico;
- lo sviluppo di un nuovo sostituto osseo con un nuovo protocollo di decellularizzazione;
- lo sviluppo di un nuovo modello di osteolisi su modello animale;
- lo sviluppo di nuove tipologie di membrane;
- lo sviluppo di una nuova superficie implantare.

Materiali e metodi

Biomateriali

Per quanto riguarda i biomateriali sono state prima di tutto analizzate le caratteristiche di prelievi autologhi essendo questi considerati il gold standard quando siano da effettuare procedure di rigenerazione ossea.

Successivamente si sono utilizzati modelli animali per indagare la risposta dei tessuti *in-vivo* all'innesto di biomateriali associati o meno a SC e a fattori infiammatori.

Nell'ambito dello studio dei biomateriali naturali sono stati inoltre studiati differenti protocolli di decellularizzazione per prelievi di osso eterologo.

Sono stati inoltre effettuati studi di biocompatibilità di sostituti ossei sintetici vetro ceramici in associazione con grafene.

Biomateriali naturali: test ex-vivo. Osso autologo

Per valutare l'influenza di diversi tempi di conservazione sulla proliferazione cellulare ed espressione genica di cellule derivate da particolato osseo autologo umano da sede intraorale al trascorrere del tempo è stato sviluppato un protocollo che prevedesse il prelievo di particolato osseo autologo dalla corticale vestibolare in sede di terzo molare mandibolare. Contestualmente ad estrazione chirurgica di terzo molare mandibolare è stato prelevato con grattino da osso apposito un campione di osso corticale lateralmente all'elemento dentario.

La procedura chirurgica ha seguito le seguenti fasi:

- anestesia tronculare del nervo alveolare inferiore e anestesia plessica in corrispondenza nelle fibre del nervo buccinatore;
- lembo a tutto spessore. Il disegno del lembo è stato deciso di volta in volta dall'operatore in relazione alle caratteristiche del soggetto;
- sollevamento del lembo per mettere a nudo la corticale ossea;
- prelievo di osso con scraper apposito dalla corticale vestibolare in corrispondenza dell'elemento da estrarre;
- prosecuzione dell'intervento standard in base alle necessità operatorie.

Il campione di osso particolato è stato suddiviso in 3 porzioni equivalenti e mantenuto in una capsula di Petri ciascuno per il tempo previsto e successivamente incluso in soluzione fissativa per l'analisi specifica.

Il particolato d'osso è stato suddiviso in tre parti equivalenti e conservato in tre capsule di Petri con tre differenti tempi di attesa: 30, 60 e 120 minuti.

Alla scadenza del tempo prestabilito il campione è stato suddiviso in due porzioni: una fissata in MTT per l'analisi di vitalità cellulare e l'altra in trizol per l'espressione genica. Entro un'ora dalla fissazione il campione in MTT è stato analizzato allo spettrofotometro per valutare la percentuale di vitalità cellulare residua. Il campione in trizol è stato conservato in congelatore fino all'analisi con tecnica PCR per l'espressione genica. Ulteriori indagini sono state effettuate sui campioni al fine di quantificare l'attività della Lattato deidrogenasi (LDH), dell'espressione di geni pro e anti apoptotici e della presenza del Fattore di necrosi tumorale (TNF α).

Saggio vitalità cellulare MTT

La vitalità cellulare è stata determinata mediante l'impiego del composto MTT, secondo il metodo descritto da Denizot e colleghi (Denizot and Lang, 1986). Si tratta di un test colorimetrico che misura in modo quantitativo l'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi. Questo enzima, attivo solo nei mitocondri delle cellule vitali, viene normalmente utilizzato come marcatore dell'attività metabolica, della vitalità e della crescita cellulare.

Il test si basa sulla riduzione del composto chimico MTT ovvero bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un colorante azolico di colore giallo, in sali di formazano di colore blu, ad opera della succinato deidrogenasi mitocondriale. La quantità di formazano prodotta è proporzionale all'attività della succinato deidrogenasi mitocondriale e quindi direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. Tramite una lettura spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda di 570 nm, è possibile quantificare i sali di formazano e successivamente correlare il valore di densità ottica (O.D.) al numero di cellule.

Il saggio è stato effettuato incubando per 3 ore i campioni cellulari con 1 mL di soluzione 0.5 mg/mL di MTT in PBS in incubatore umidificato al 5% CO₂ e a 37°C. Successivamente, la soluzione MTT è stata delicatamente eliminata ed i sali di formazano sono stati sciolti in 500 μ L di soluzione estraente (90% isopropanolo e

10% dimetilsolfossido) per 30 minuti in incubatore. Infine le soluzioni blu di formazano sono state lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570 nm.

Espressione genica

Estrazione e quantificazione di RNA

L'estrazione di RNA dei campioni è stata effettuata utilizzando una soluzione monofasica a base di fenolo e guanidina isotiocianato, il TRIzol® Reagent (Invitrogen). L'omogeneizzazione dei campioni con tale reagente determina la lisi delle membrane cellulari garantendo l'integrità dell'RNA inibendo l'attività degli enzimi RNasi.

I campioni sono stati trasferiti in microprovette con 1 ml di TRIzol® Reagent ed incubati per 5 minuti a 30°C per consentire la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. In seguito, sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e si è proceduto agitando vigorosamente 30 secondi prima della incubazione a temperatura ambiente per altri 2 minuti. Dalla successiva centrifugazione a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C sono state ricavate tre fasi: una fase superiore, acquosa, limpida contenente l'RNA, un'interfase centrale, bianca contenente il DNA e una fase inferiore rosa, contenente proteine, fenolo e cloroformio.

La fase acquosa è stata trasferita in una nuova microprovetta e sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo al fine di precipitare l'RNA. Dopo aver incubato i campioni per 10 minuti a temperatura ambiente, essi sono stati centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Il pellet derivante dalla centrifugazione, costituito dall'RNA, è stato lavato con 1 ml di etanolo 75 % freddo, agitato e centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti a 4°C.

Successivamente l'RNA è stato asciugato a temperatura ambiente per 10 minuti e risospeso in acqua DNase RNase-free.

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata con lo spettrofotometro NanoDrop (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific), il quale, oltre a stimare la concentrazione dei campioni, ne determina la purezza da contaminanti. Lo strumento fornisce i rapporti delle assorbanze 260/280 e 260/230, i cui valori devono essere rispettivamente compresi negli intervalli 1,8-2 e 2-2,2 al fine di reputare i campioni di RNA puri da contaminanti. Valori bassi di tali rapporti indicano la presenza di proteine, fenolo e altri contaminanti organici che assorbono attorno a 280 e 230 nm.

Sintesi del DNA complementare

Il DNA complementare (cDNA) è stato sintetizzato seguendo il protocollo Invitrogen: First-Strand cDNA synthesis using M-MLV RT. Tale protocollo prevede l'impiego dell'enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) che, utilizzando il filamento di RNA come stampo, sintetizza un filamento di DNA complementare.

Per ciascun campione sono stati retrotrascritti 500 ng di RNA in un volume di reazione pari a 20 μ l. In microprovette nuclease-free sono stati mescolati: 1 μ l di Oligo (dT)12-18 [500 μ g/ml] (Invitrogen); 500 ng di RNA totale; 1 μ l di dNTP Mix [10 mM] (Invitrogen) e acqua distillata nuclease-free fino al volume di 12 μ l. Le miscele sono state riscaldate a 65°C per 5 minuti e successivamente poste in ghiaccio per alcuni minuti.

Dopo una breve centrifugata per raccogliere il contenuto sul fondo delle microprovette, sono stati aggiunti: 4 μ l di First-Strand Buffer 5X (Invitrogen); 2 μ l di DTT [0,1 M] (Invitrogen) e 1 μ l di RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor [40 U/ μ l] (Invitrogen). Le miscele di reazione, dopo essere state mescolate delicatamente, sono state incubate a 37°C per 2 minuti. In seguito, ad ogni campione spipettando delicatamente è stato aggiunto 1 μ l dell'enzima M-MLV RT [200 U/ μ l] (Invitrogen). Dopo aver incubato i campioni a 37°C per 50 minuti, la reazione è stata inattivata riscaldando i campioni a 70°C per 15 minuti.

Real Time PCR

La Real Time PCR è una versione avanzata della reazione a catena della polimerasi (PCR) che consente, attraverso l'uso di coloranti o sonde fluorescenti, di quantificare in tempo reale l'amplificazione del DNA correlando l'intensità di fluorescenza alla concentrazione dei prodotti di PCR. Ogni reazione di Real Time PCR è caratterizzata da un accumulo di segnale fluorescente che viene definito dal Ct (cycle threshold), cioè dal numero di cicli richiesti per ottenere un'intensità del segnale superiore al rumore di fondo del sistema. A quantità elevate di DNA di partenza corrisponde un veloce incremento del segnale fluorescente e quindi un basso valore di Ct.

Il segnale fluorescente viene generato aggiungendo alla miscela di reazione il colorante fluorescente SYBR Green I. Si tratta di una cianina asimmetrica intercalante il DNA a doppio filamento. Quando le molecole di SYBR Green I sono libere in soluzione non presentano rilevante fluorescenza; al contrario quando

legano il DNA a doppia elica (in corrispondenza del solco minore) esse subiscono un cambio conformazionale ed aumentano considerevolmente la quantità di fluorescenza emessa.

Per ciascun campione sono stati amplificati 2.5 μ l di cDNA in un volume di reazione pari a 25 μ l. In microprovette nuclease-free da 200 μ l sono stati mescolati: 12.5 μ l di FastStart SYBR Green Master [2X] (Roche); 0.75 μ l di Forward primer [10 μ M]; 0.75 μ l di Reverse primer [10 μ M]; 8.5 μ l di acqua Dnasi-Rnasi free (GIBCO). Dopo aver mescolato delicatamente e centrifugato brevemente ogni miscela sono stati aggiunti 2.5 μ l di cDNA.

Le reazioni di Real Time PCR vengono condotte in un termociclatore Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research, Australia), seguendo il programma di amplificazione specificato nella Tabella 2.

Cicli	Passaggio	Temperatura	Tempo
1	Denaturazione iniziale del cDNA	95 °C	10 minuti
40	Denaturazione	95 °C	10 secondi
	Appaiamento dei primers	60 °C	30 secondi
	Estensione	72 °C	30 secondi
1	Estensione finale	72 °C	10 minuti

Tabella 2: Programma di amplificazione della Real Time PCR.

L'analisi dell'espressione genica è stata determinata normalizzando la quantità del trascritto del gene di interesse con quella di un gene di riferimento (GAPDH) nello stesso campione. La normalizzazione è stata effettuata applicando la seguente formula: "2DCt" dove 2 rappresenta l'efficienza di amplificazione pari al 100%, DCt = Ct gene di riferimento - Ct gene interesse.

Infine i profili genici sono stati presentati come il rapporto (R) fra il 2DCt della condizione di riferimento e il 2DCt normalizzato della condizione controllo.

Biomateriali naturali: test in-vivo. Rialzo seno mascellare su pecora

Per l'esperimento sono state utilizzate venti pecore femmine adulte. Durante le procedure chirurgiche, gli animali sono stati premedicati con metadone IM (0,2-0,3 mg/kg) e xilazina (0,1 mg/kg), e quindi l'anestesia è stata indotta con propofol (3-

5 mg/kg IV). Dopo l'intubazione oro-tracheale, l'anestesia generale è stata mantenuta con isoflurano inalato (1-1,6%, 1,19-1,56 MAC) in ossigeno/aria medica. Il campo operatorio è stato preparato rasando la pelle per visualizzare i punti di riferimento principali, ovvero, la vena angolare dell'occhio e l'arteria trasversale del muso. Le pecore sono state preparate nel modo usuale per un intervento chirurgico sterile. Il sito chirurgico e la linea di incisione sono stati individuati e medicati con iodio. Nel sito chirurgico è stata somministrata circa 3,6 mL di anestesia locale (Polocaine 2%, 1:20.000 levonordefrin; Astra Pharmaceuticals, Westborough, Mass). E' stata eseguita un'incisione caudodorsale obliqua, rostroventrale, extraorale di circa 5 cm di lunghezza oltre l'aspetto più ventrale del seno mascellare. Il tessuto sottocutaneo e il muscolo massetere sono stati divisi per esporre il periostio mascellare, che è stato inciso e sollevato dorsalmente. Si è utilizzata una fresa chirurgica rotante per effettuare una botola rettangolare nella parete laterale del seno (Figura 2), sotto abbondante irrigazione con soluzione fisiologica.

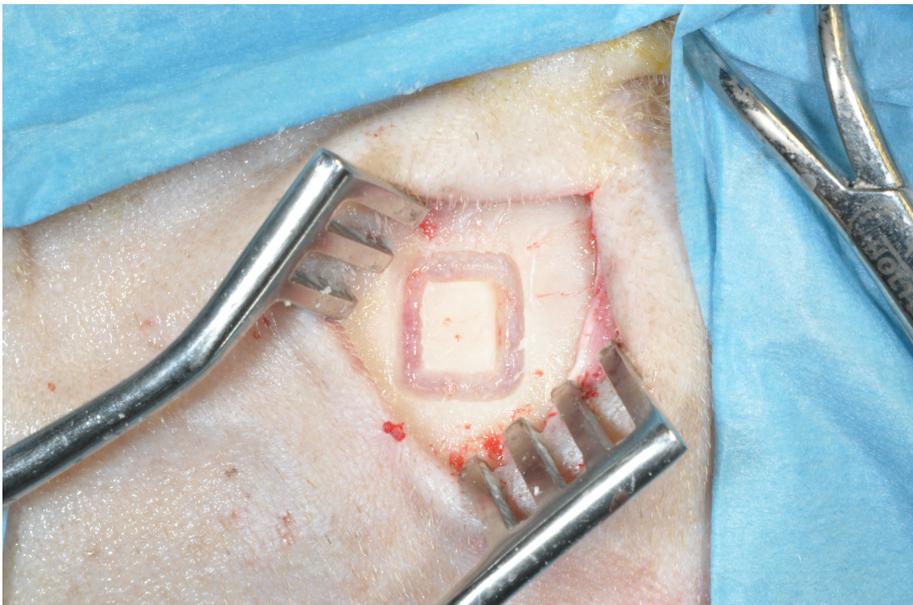


Figura 2: botola di accesso al seno mascellare

La finestra ossea è stata rimossa lungo l'osteotomia con uno scalpello da osso (Figura 3).



Figura 3: botola di accesso al seno mascellare rimossa e esposizione della membrana di Schneider

Dopo la rimozione della botola ossea si è proceduto a scollare la membrana di Schneider tramite strumenti dedicati per rialzo del seno mascellare. Il rialzo del seno mascellare è stato eseguito bilateralmente in ogni pecora. Le pecore sono state divise in due gruppi di guarigione prima del sacrificio: 15 e 30 giorni. Ogni gruppo era composto da 10 pecore, di cui sei hanno ricevuto come materiale di innesto in un seno mascellare un biomateriale naturale composto da idrossiapatite granulare (Bio-Oss ® Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Svizzera) da sola, mentre nel lato controlaterale è stata inserita idrossiapatite granulare (Bio-Oss ® Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Svizzera) in presenza di ADPSc (Figura 4).

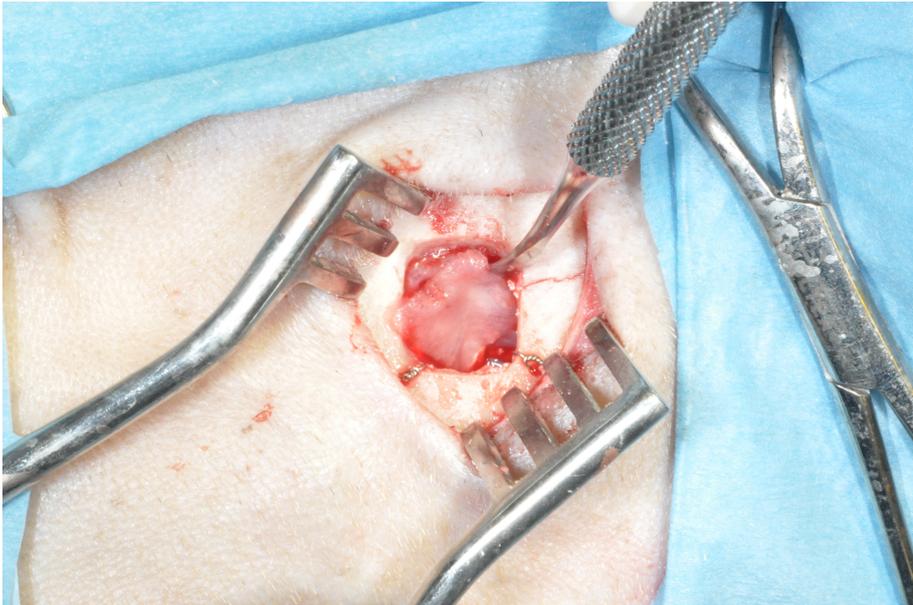


Figura 4: membrana di Schneider scollata e innesto di biomateriale

Le altre quattro pecore hanno ricevuto come materiale da innesto in un seno mascellare un biomateriale naturale composto da idrossiapatite granulare (Bio-Oss ® Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Svizzera) più TNF per indurre uno stato infiammatorio, mentre il lato controlaterale ha ricevuto idrossiapatite granulare (Bio-Oss ® Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Svizzera) più ADSc e TNF α per indurre uno stato infiammatorio.

Un volume uguale di materiale da innesto è stato usato (3 cm³) all'interno di ogni cavità del seno.

Le fasce profonda e superficiale del muscolo massetere sono state riposizionate con filo da sutura riassorbibile Vicryl 3/0. Il tessuto sottocutaneo e la pelle sono stati chiusi separatamente in maniera simile con Vicryl 3/0 (Figura 5).



Figura 5: I tessuti sottocutanei e la cute sono stati suturati separatamente

Gli animali sono stati trattati e.v. con 15 mg/kg di ampicillina (Vetamplus®, Fatro) ogni 12 ore per 3 giorni e con tramadolo 2 mg/kg. Le ferite chirurgiche sono state controllate tutti i giorni.

I gruppi di animali sono stati sacrificati a 15 e 30 giorni, applicando una dose letale di tiopentale (Pentothal Sodium, Intervet) 10-15 mg/kg IV e di embutramide (Tanax®). Le teste sono state rimosse, sono stati ricavati i signoli preparati anatomici di seno mascellare e fissati i singoli blocchi ossei contenenti il seno rialzato e tessuti duri circostanti.

Preparazione istologica

I preparati anatomici sono stati fissati per una notte in formalina al 3,7% a 4 ° C, decalcificati per 20 giorni con una soluzione di formalina e acido formico, e inclusi in paraffina. L'inclusione in paraffina è stata effettuata con i seguenti passaggi:

- Due passaggi di 30 minuti in etanolo al 50%;
- Tre passaggi di 30 minuti in etanolo al 70%;
- Due passaggi di 30 minuti in etanolo al 95%;
- Due passaggi di 30 minuti in etanolo al 100%;
- Xilene fino a compensazione;
- Due passaggi di un'ora in paraffina liquida a 60 ° C;
- Inclusione.

Sono state tagliate sezioni seriali di 7 mm perpendicolarmente ai difetti ossei e

all'osso circostante (Reichert-Jung 2050, Nussloch, Germania). Le sezioni ossee sono state colorate con ematossilina/eosina e con soluzione tricromica di Masson (MT) e osservati al microscopio ottico.

Analisi semi-quantitativa delle cellule

Per analizzare la risposta cellulare ai trattamenti, sono stati effettuati esami microscopici sulle sezioni. Le cellule sono state identificate in base al colorante ematossilina/eosina in: cellule infiammatorie, cellule endoteliali e fibroblasti; dalla soluzione tricromica di Masson (MT) per il rilevamento della struttura ossea in collagene di tipo I, osso maturo, tessuto osseo.

Biomateriali naturali: test in-vivo. Difetto osseo peri-impanatre su cane

Per l'esperimento sono stati utilizzati sei cani Labrador. Durante le procedure chirurgiche, gli animali sono stati pre-anestetizzati con atropina 0,04 mg/kg + medetomidina 0,04 mg/kg + ketamina 5 mg/kg e sedati con isoflurano 1,5 a 3% CAM + O₂ al 95%.

Sono stati estratti bilateralmente tutti i premolari inferiori e i primi molari. Tre mesi dopo l'estrazione dei denti è stata eseguita un'incisione crestale nella regione molare e premolare in entrambi i lati della mandibola. Sono stati eseguiti lembi mucoperiostei a tutto spessore e, nelle creste alveolari edentule, sono stati identificati sei siti sperimentali a destra e a sinistra. La preparazione chirurgica dei siti è stata effettuata secondo la metodica del sistema implantare Sweden & Martina (Sweden & Martina, Due Carrare, Padova, Italia). Due frese da preparazione per impianti sono state usate per preparare ciascun sito ricevente, di lunghezza 10 mm e 3,3 mm di diametro (Premium™, Sweden & Martina).

Successivamente, altre frese appositamente progettate sono state usate per ampliare il sito implantare marginale da 5 mm a 5,4 mm (Figura 6).

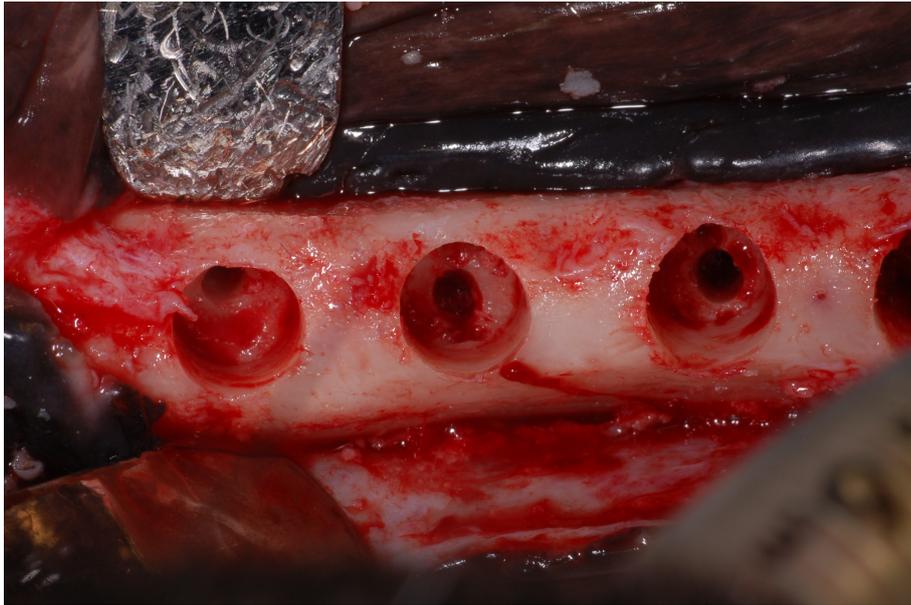


Figura 6: preparazione chirurgica dei siti.

Sono stati successivamente posizionati gli impianti al livello della cresta ossea e su questi sono state avvitate le viti di guarigione. Dopo il posizionamento, si è verificato un gap marginale attorno agli impianti (Figura 7).

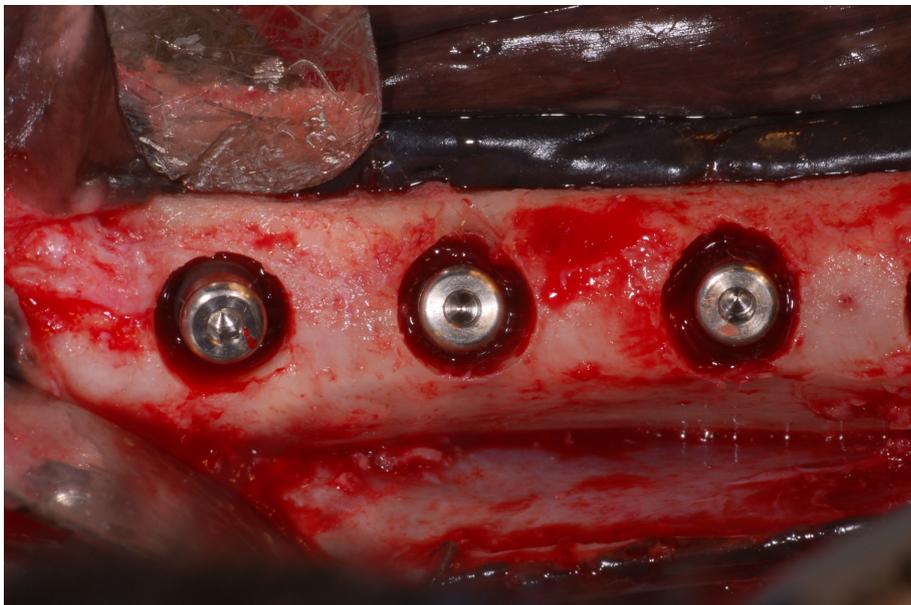


Figura 7: impianti in posizione. E' visibile il gap peri-implantare

I difetti marginali nel lato destro della mandibola sono stati riempiti con idrossiapatite granulare (Bio-Oss®; granuli spongiosa, granulometria 0,25-1 mm; Geistlich Pharmaceutical, Wolhusen, Svizzera) mescolato con un concentrato di

cellule staminali (ADSC). I difetti nella parte sinistra della mandibola sono stati riempiti solamente con idrossiapatite granulare (Bio-Oss®, granuli spongiosa, granulometria 0,25-1 mm; Geistlich Pharmaceutical, Wolhusen, Svizzera) (Figura 8).

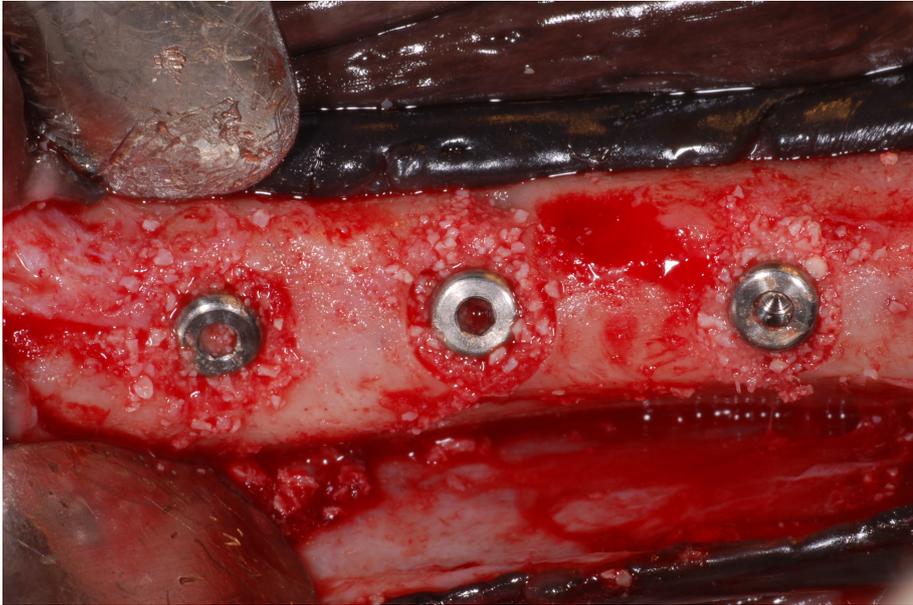


Figura 8: gap peri-implantare riempito con biomateriale arricchito con ADSCs

I lembi sono stati suturati permettendo una guarigione completamente sommersa. Il sacrificio degli animali è stato previsto dopo 1 mese dalla guarigione. Dopo l'intervento gli animali hanno assunto antibiotici (Enrofloxacina 3 ml/48 kg) e tramadolo 2 mg/kg per 8 giorni. Gli animali sono stati tenuti in canili e recinti presso il laboratorio dell'Università con libero accesso all'acqua e al cibo con una dieta equilibrata morbida. Dopo l'intervento, le ferite sono state controllate ogni giorno per monitorare eventuali segni clinici di complicanze. I controlli sono stati eseguiti regolarmente per tutto l'esperimento. Gli animali sono stati sacrificati secondo il seguente protocollo di eutanasia: eparina 1000 UI + ketamina 10 mg/kg + xilacina 1mg/kg + succinilcolina 0,2 mg/kg e KCl 25 meq.

Preparazione istologica

Le mandibole sono state sezionate, e sono stati ricavati dei singoli blocchetti ossei contenenti un impianto e i tessuti molli e duri circostanti che sono stati fissati in soluzione di formaldeide al 4%. I campioni sono stati disidratati in una serie di soluzioni di etanolo graduate, e infine incorporati nella resina.

I blocchetti sono stati sezionati secondo un piano bucco-linguale seguendo l'asse longitudinale degli impianti, con una fresa diamantata montata su un microtomo. Le sezioni centrali sono state raccolte e, dopo essere state lucidate, sono state eseguite delle sezioni di circa 50 micron ottenute per usura. I vetrini istologici sono stati colorati con il blu di Stevenel e con il rosso di alizarina ed esaminate al microscopio ottico standard per l'analisi istologica (Figura 9).



Figura 9: preparazione istologica di circa 50 μm

Per l'analisi istologica, eseguita con il microscopio ottico (20x), tutti i vetrini istologici sono stati osservati per rilevare: PMN, cellule fagocitiche e non fagocitiche, fibroblasti, cellule endoteliali, collagene di tipo I e formazione di nuovo osso. E' stata studiata anche la neoangiogenesi per vedere se, nelle prime fasi della guarigione, questa potesse essere accelerata dalla presenza delle cellule staminali.

Biomateriali naturali: femore bovino

I campioni d'osso sottoposti a protocollo di decellularizzazione provengono dal macello di Chions (PN). Sono stati decellularizzati sezioni di osso provenienti dall'epifisi del femore bovino, composti quindi prevalentemente da osso spongioso.

Il protocollo ha previsto l'utilizzo dei metodi fisici di congelamento e scongelamento associati all'impiego di alte temperature tramite autoclave che nel complesso determinano la lisi cellulare. Infatti, l'acqua penetra all'interno delle

cellule e poi congelandosi aumenta il proprio volume grazie alla formazione di cristalli di ghiaccio, che provocano la rottura della membrana cellulare con la successiva fuoriuscita dei componenti citoplasmatici. Tuttavia poiché il tessuto osseo è un tessuto molto denso si sono fatti susseguire più cicli di congelamento/scongelo alternati alle alte temperature.

Le fasi successive del protocollo hanno previsto l'utilizzo di soluzioni a concentrazioni decrescenti di Triton X-100 per la rimozione dei detriti cellulari. Il Triton X-100 rientra nella categoria dei tensioattivi non ionici, presenta un gruppo idrofilo di ossido di polietilene e un gruppo lipofilo o idrofobico. Questo detergente possiede anche la capacità di rendere più permeabili le membrane delle cellule eucariotiche, aiutando ulteriormente la rimozione della componente cellulare. Il Triton X-100 è stato utile per la rimozione della parte lipidica del materiale, molto rappresentata nella zona dell'osso spugnoso nell'epifisi del femore. Il Triton X-100 è stato utilizzato a concentrazioni molto basse per evitare una permanenza dell'agente chimico sul materiale rendendolo tossico per le successive applicazioni. I campioni, arrivati in laboratorio in recipienti contenenti PBS (Phosphate buffered saline, EuroClone) all'1% di P/S (Penicillina e Streptomicina, EuroClone), sono stati ulteriormente puliti in capsule Petri con PBS. Così preparati risultavano pronti per essere sottoposti al protocollo di decellularizzazione.

I campioni di osso sono stati ridotti manualmente in frammenti più piccoli e così preparati sono stati sottoposti a protocollo di decellularizzazione.

Tale protocollo consiste in un susseguirsi di passaggi di congelamento e scongelamento dell'osso:

- Lavare con salina [NaCl 0,9%] per 1 h a 4 °C;
- Congelare a -80 °C O.N. in acqua milliQ autoclavata;
- Congelare a -196 °C 2 giorni in acqua milliQ autoclavata;
- Autoclavare a +121 °C 20 minuti a secco;
- Congelare a -196 °C 2 giorni in acqua milliQ autoclavata;
- Autoclavare a +121 °C 20 minuti in acqua milliQ autoclavata;
- Trattare con TRITON X-100 1% in ipotonica (PBS diluito dieci volte in acqua milliQ autoclavata) per 2 giorni a 4 °C;
- Trattare con TRITON X-100 0,1% in ipotonica 2 giorni a 4 °C;
- Disidratare mediante scala ascendente degli alcoli (etanolo in acqua milliQ autoclavata) 50% → 70% → 96%

- O.N. a 4°C → 100% per 1h;
- Asciugare sotto cappa biologica per 8h
- Congelare

La parte finale della procedura ha previsto la disidratazione dei blocchetti trattati. Tal fine è stato raggiunto mediante scala ascendente degli alcoli che ha permesso la perdita graduale della componente acquosa evitando un'alterazione eccessiva della conformazione delle proteine.

Verifica Dell'Efficacia Del Protocollo

I blocchetti di osso trattato con protocollo di decellularizzazione sono stati esaminati al fine di verificare l'eliminazione della componente cellulare e la conservazione al tempo stesso dell'ultrastruttura della matrice extracellulare nativa. Quest'ultimo elemento è molto importante poiché un buon sostituto osseo dovrebbe avvicinarsi molto alla morfologia della matrice al fine di promuovere un rapido differenziamento delle cellule osteoprogenitrici e fornire loro un ottimo supporto per la migrazione, attecchimento e proliferazione; favorendo una rapida deposizione di tessuto neoformato. Per valutare queste caratteristiche sono stati eseguiti opportuni test in vitro.

La verifica avviene confrontando sezioni di osso decellularizzato (osso trattato) con sezioni di tessuto osseo proveniente dalla stessa zona anatomica del femore bovino ma non sottoposte a protocollo (osso controllo).

Test di Proliferazione: MTT

Il test di proliferazione MTT è stato eseguito su quattro blocchetti di osso controllo ed altrettanti di osso trattato al fine di ottenere dei dati significativi. Lo scopo è quello di valutare la presenza di cellule vive sul materiale trattato, trattandosi di un protocollo di decellularizzazione ci si aspetta che dopo il trattamento il materiale biologico presenti un'attività cellulare nulla. L'MTT è un saggio che consiste in un test colorimetrico.

Valutazione Della Biocompatibilità Dell'Osso Decellularizzato

Valutata l'efficacia del protocollo di decellularizzazione e la presenza delle proteine fondamentali della matrice ossea si è testata la capacità del biomateriale di far vivere e proliferare le cellule.

Per questo test i blocchetti di osso decellularizzato sono stati ridotti manualmente in piccoli granuli, al fine di ottenere un materiale omogeneo e facilmente maneggiabile. Ridurre le sezioni ad una granulometria più piccola permette anche di aumentare la superficie di contatto tra cellule e biomateriale, creando così un ambiente più ottimale per le cellule. Questa situazione consente di valutare al meglio le proprietà dello scaffold elaborato, sia per quanto riguarda la capacità di proliferazione sia quella di differenziazione.

L'analisi è stata condotta seminando MSC derivanti da tessuto adiposo, ADSC, sul biomateriale in terreno non differenziativo. Le cellule sono state lasciate in coltura per un tempo totale di 21 giorni valutando la proliferazione cellulare mediante test MTT a 4 tempi: 3, 7, 14 e 21 giorni. Dalla quantificazione allo spettrofotometro si è potuta ricavare una visione globale sulla proliferazione delle cellule sul biomateriale.

Valutazione Dell'Osteoinduttività Del Biomateriale

Dopo aver verificato la capacità del biomateriale di far vivere e proliferare le cellule seminate sulla sua superficie si è valutata la sua osteoinduttività, ovvero la capacità di indurre il differenziamento cellulare in senso osteoblastico. Tale caratteristica dipende dalla struttura del biomateriale; più essa ricorda la matrice extracellulare del tessuto osseo più il biomateriale sarà osteoinduttivo.

A tale scopo, sono stati condotti esperimenti in cui ADSC sono state seminate e coltivate sul biomateriale per 21 giorni in terreno non differenziativo. Al termine dei 21 giorni, si è effettuata un'analisi Real-Time PCR per valutare l'espressione dei geni codificanti proteine collagenose e noncollagenose da parte delle ADSC in coltura sul biomateriale.

Grazie a questa indagine molecolare si è valutata l'espressione genica di mRNA codificanti le proteine coinvolte nel processo di ossificazione, quali l'osteopontina, l'osteocalcina, l'osteonectina e il collagene di tipo I, principale componente della matrice extracellulare ossea.

L'analisi prevede la valutazione del livello di espressione del gene housekeeping (costitutivo della cellula) con il quale vengono normalizzati i valori di espressione dei geni di interesse (presenti nelle cellule del tessuto osseo). Il gene housekeeping scelto è il GAPDH (Gliceraldeide 3-fosfato Deidrogenasi). Dopo la normalizzazione si procede rapportando il valore ottenuto ad una condizione standard, ADSC in

monostrato in terreno non differenziativo, per valutare l'espressione dei marker ossei rispetto a cellule non a contatto con il biomateriale.

Innesto Dell'Osso Decellularizzato In Vivo

Sono stati condotti esperimenti in vivo su pecore. Il biomateriale ridotto in granuli è stato utilizzato come materiale riempitivo della cavità del seno mascellare nell'operazione chirurgica di rialzo del seno mascellare. L'operazione è stata eseguita su pecore di razza bergamasca che sono state sacrificate a 15 e 30 giorni. Dopo il sacrificio le biopsie della parte interessata sono state fissate in formalina tamponata al 4% e sottoposte a decalcificazione. La decalcificazione è stata eseguita utilizzando una soluzione decalcificante al 10% di EDTA a pH 7.2. Questo processo ha richiesto tre mesi in quanto le sezioni oltre ad essere di dimensioni notevoli presentavano un tessuto osseo ovino molto compatto e duro. Al termine dei tre mesi le biopsie sono state incluse in paraffina e sono state preparate delle sezioni dello spessore di 7 μm da sottoporre a due colorazioni istologiche, Ematossilina ed Eosina e Tricromica di Masson.

Biomateriali sintetici: test in-vitro

Nel campo dei biomateriali sintetici, sono stati studiati dei materiali vetroceramici creati artificialmente tramite stampanti tridimensionali in forma di disco e di reticolo.

Il materiale vetroceramico contiene 2 fasi silicatiche bioattive, wollastonite (CaSiO_3) e diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), insieme ad una fase vetrosa sodio fosfatica (non si tratta di un materiale cristallino, con una quota di fase amorfa, derivante dalla cristallizzazione controllata di un vetro, ma dalla reazione tra SiO_2 , procurata dall'ossidazione di un polimero, e fillers).

Si sono ottenuti monoliti, utilizzando sodio-fosfato anidro e altri filler in polimero solido, come schiume, utilizzando sodio-fosfato tq e altri filler in polimero liquido (questo sale passa alla forma anidra a 300-350°C, quando i siliconi sono ancora polimeri). Per migliorare la densificazione è stato aggiunto un vetro CaO-MgO- $\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$, il quale cristallizza sempre dando wollastonite e diopside che inoltre si ritiene dovrebbe migliorare la biocompatibilità.

Su ogni disco di biomateriale sono stati seminati fibroblasti umani al fine di valutare la tossicità dei materiali per le cellule secondo il test MTT.

Test MTT

Per determinare il tasso di proliferazione delle cellule coltivate sui dischi, il test della citotossicità basato sul test del MTT (metil tiazolil-tetrazolium) è stato effettuato secondo il metodo di Denizot e Lang con piccole modifiche (Denizot e Lang, 1986). Il test si basa sulla vitalità mitocondriale, ossia solo mitocondri funzionali possono ossidare una soluzione MTT, dando come prodotto finale la tipica colorazione blu-violetto. Dopo la raccolta dal terreno di coltura, le cellule sono state incubate per 3 ore a 37°C in 1 ml di 0,5 mg/mL di soluzione di MTT preparata in soluzione PBS. Dopo la rimozione della soluzione di MTT con una pipetta, è stato aggiunto 0,5 ml di 10% dimetilsolfossido in isopropanolo (idMso) per 30 min a 37°C. Per ogni campione, i valori di assorbanza a 570 nm sono stati registrati per due volte in doppio in aliquote di 200 microlitri depositati in piastre da 96 pozzetti utilizzando un lettore di piastre (Victor 3 Perkin Elmer).

Membrane

Riguardo le membrane sono stati sviluppati e testati *in vitro* differenti protocolli di decellularizzazione per il trattamento di membrane sviluppate da pericardio bovino. Successivamente le stesse sono state testate *in vivo* su modello murino. Parallelamente è stata studiata *in vitro* una membrana sintetica di polietilene glicole con test MTT e con array per il controllo genetico.

Membrane naturali: pericardio bovino

Sviluppo in vitro di protocollo per la deproteinizzazione e decellularizzazione di pericardio

I campioni di pericardio bovino sottoposti a protocollo di decellularizzazione provengono dal macello di Chions (PN). Al fine di identificare il protocollo migliore per deproteinizzare e decellularizzare i campioni, il pericardio bovino è stato trattato secondo i protocolli illustrati nella tabella seguente (Tabella 3).

		PROT 1	PROT 2	PROT 3	PROT 4
1	lava con SALINA [NaCl 0,9%]	1 h a RT	1 h a RT	1 h a RT	1 h a RT
2	IPOTONICA [PBS diluito 10 volte]	3 h a 4°C AGITAZIONE	1 h a 37°C	3 h a 4°C	1 h a 37°C
	10% DMSO			SONICARE 30 min 2 volte	SONICARE 15 min 2 volte
	Acido Ascorbico IP (inibitore di proteasi)				
3	IPOTONICA	16 h a RT AGITAZIONE	3 h a 37°C	16 h a 4°C	3 h a 37°C
	10% DMSO Acido Ascorbico				
4	1% TRITON in IPOTONICA	8 h a 4°C AGITAZIONE	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a 4°C	8 h a RT
	IP			SONICARE 30 min 4 volte	SONICARE 30 min 4 volte
5	0,1% TRITON in IPOTONICA	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
6	IPERTONICA [0,5 M NaCl in PBS]	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT	8 h a RT
				SONICARE 30 min 4 volte	SONICARE 30 min 4 volte
7	IPERTONICA [0,5 M NaCl in PBS]	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
8	10 mM SD in IPOTONICA	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT	8 h a RT
				SONICARE 30 min 4 volte	SONICARE 30 min 4 volte
9	10 mM SD in IPOTONICA	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
10	lava con IPOTONICA	1 h a RT AGITAZIONE	1 h a RT AGITAZIONE	1 h a RT	1 h a RT
	10%				
11	ISOPROPANOLO in SALINA	24 h a 4°C AGITAZIONE	24 h a 4°C AGITAZIONE	24 h a 4°C	24 h a 4°C
12	PBS	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C	12 h a 4°C
13	congela a -80 °C				

		PROT 5	PROT 6	PROT 7	PROT 8
1	lava con SALINA [NaCl 0,9%]	1 h a RT	1 h a RT	1 h a RT	1 h a RT
2	IPOTONICA [PBS diluito 10 volte] 10% DMSO Acido Ascorbico IP (inibitore di proteasi)	3 h a 4°C AGITAZIONE	1 h a 37°C	3h a 4°C SONICARE 30 min 2 volte	1 h a 37°C SONICARE 15 min 2 volte
3	IPOTONICA 10% DMSO Acido Ascorbico	16 h a RT AGITAZIONE	3 h a 37°C	16 h a 4°C	3 h a 37°C
4	1% TRITON in IPOTONICA IP	8 h a 4°C AGITAZIONE	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte
5	0,1% TRITON in IPOTONICA	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
6	IPERTONICA [0,5 M NaCl in PBS]	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte
7	IPERTONICA [0,5 M NaCl in PBS]	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
8	0,5% SD + 0,5% SDS in H2O mQ	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte
9	0,5% SD + 0,5% SDS in H2O mQ	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
10	lava con IPOTONICA 10%	1 h a RT AGITAZIONE	1 h a RT AGITAZIONE	1 h a RT	1 h a RT
11	ISOPROPRANOLO in SALINA	24 h a 4°C AGITAZIONE	24 h a 4°C AGITAZIONE	24 h a 4°C	24 h a 4°C
12	PBS	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C	12 h a 4°C

13		congela a -80 °C			
		PROT 9	PROT 10	PROT 11	PROT 12
1	lava con SALINA [NaCl 0,9%]	1 h a RT	1 h a RT	1 h a RT	1 h a RT
2	IPOTONICA [PBS diluito 10 volte] 10% DMSO Acido Ascorbico IP (inibitore di proteasi)	3 h a 4°C AGITAZIONE	1 h a 37°C	3 h a 4°C SONICARE 30 min 2 volte	1 h a 37°C SONICARE 15 min 2 volte
3	IPOTONICA 10% DMSO Acido Ascorbico	16 h a RT AGITAZIONE	3 h a 37°C	16 h a 4°C	3 h a 37°C
4	1% TRITON in IPOTONICA IP	8 h a 4°C AGITAZIONE	8 h a 4°C AGITAZIONE	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte
5	0,1% TRITON in IPOTONICA	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
6	PBS 0,05% TRYPSIN 0,02% EDTA RNAsi DNAsi	8 h a 37°C	8 h a 37°C	8 h a 37°C	8 h a 37°C
7	IPERTONICA [0,5 M NaCl in PBS]	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
8	10 mM SD in IPOTONICA	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte	8 h a RT SONICARE 30 min 4 volte
9	10 mM SD in IPOTONICA	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
10	lava con IPOTONICA 10%	1 h a RT AGITAZIONE	1 h a RT AGITAZIONE	1 h a RT	1 h a RT
11	ISOPROPANOLO in SALINA	24 h a 4°C AGITAZIONE	24 h a 4°C AGITAZIONE	24 h a 4°C	24 h a 4°C

12	PBS	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C	12 h a 4°C
13	congela a -80 °C				
		PROT 13	PROT 14	PROT 15	PROT 16
1	lava con SALINA [NaCl 0,9%]	1 h a RT	1 h a RT	1 h a RT	1 h a RT
2	IPOTONICA [PBS diluito 10 volte]	3h a 4°C AGITAZIONE	1 h a 37°C	3h a 4°C	1 h a 37°C
	10% DMSO			SONICARE 30 min 2 volte	SONICARE 15 min 2 volte
	Acido Ascorbico IP (inibitore di proteasi)				
3	IPOTONICA	16 h a RT AGITAZIONE	3 h a 37°C	16 h a 4°C	3 h a 37°C
	10% DMSO Acido Ascorbico				
4	1% TRITON in IPOTONICA	8 h a 4°C AGITAZIONE	8 h a 4°C AGITAZIONE	8 h a RT	8 h a RT
	IP			SONICARE 30 min 4 volte	SONICARE 30 min 4 volte
5	0,1% TRITON in IPOTONICA	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
6	PBS	8 h a 37°C	8 h a 37°C	8 h a 37°C	8 h a 37°C
	0,05% TRYPSIN 0,02% EDTA RNAsi DNAsi				
7	IPERTONICA [0,5 M NaCl in PBS]	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
8	0,5% SD + 0,5% SDS in H2O mQ	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT AGITAZIONE	8 h a RT	8 h a RT
				SONICARE 30 min 4 volte	SONICARE 30 min 4 volte
9	0,5% SD + 0,5% SDS in H2O mQ	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT	16 h a RT
10	lava con IPOTONICA	1 h a RT AGITAZIONE	1 h a RT AGITAZIONE	1 h a RT	1 h a RT
11	10%	24 h a 4°C	24 h a 4°C	24 h a 4°C	24 h a 4°C

	ISOPROPANOLO in SALINA	AGITAZIONE	AGITAZIONE		
12	PBS	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C	12 h a 4°C
13	congela a -80 °C				
		PROT 17	PROT 18		
1	lava con SALINA [NaCl 0,9%]	1 h a RT	1 h a RT		
2	congela	a secco 1 h a - 80°C	in H2O 1 h a - 80°C		
3	scongela	1 h a RT	1 h a RT		
4	congela	a secco 1 h a - 80°C	in H2O 1 h a - 80°C		
5	scongela	1 h a RT	1 h a RT		
6	congela in IPOTONICA	16 h a -80°C	16 h a -80°C		
7	scongela in IPOTONICA	1 h a RT	1 h a RT		
8	congela in IPOTONICA	1 h a -80°C	1 h a -80°C		
9	scongela in IPOTONICA	1 h a RT	1 h a RT		
10	IPOTONICA 0,1% SD IP 1x 0,1% EDTA	3 h a RT AGITAZIONE	3 h a RT AGITAZIONE		
11	PBS + IP	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE		
12	PBS 10 mM MgCl2 50 ug/mL BSA 50 U/mL DNase 1 U/mL RNase	3 h a 37°C	3 h a 37°C		
13	PBS + IP	3 h a RT AGITAZIONE	3 h a RT AGITAZIONE		
14	10% ISOPROPANOLO in SALINA	24 h a 4°C AGITAZIONE	24 h a 4°C AGITAZIONE		

15	PBS	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C AGITAZIONE
16	congela a -80 °C		
		PROT 19	PROT 20
1	lava con SALINA [NaCl 0,9%]	1 h a RT	1 h a RT
2	congela	a secco 1 h a - 80°C	in H2O 1 h a - 80°C
3	scongela	1 h a RT	1 h a RT
4	congela	a secco 1 h a - 80°C	in H2O 1 h a - 80°C
5	scongela	1 h a RT	1 h a RT
6	congela in IPOTONICA	16 h a -80°C	16 h a -80°C
7	scongela in IPOTONICA	1 h a RT	1 h a RT
8	congela in IPOTONICA	1 h a -80°C	1 h a -80°C
9	scongela in IPOTONICA	1 h a RT	1 h a RT
10	congela in IPOTONICA	1 h a -80°C	1 h a -80°C
11	scongela in IPOTONICA	1 h a RT	1 h a RT
12	congela in IPOTONICA	16 h a -80°C	16 h a -80°C
13	scongela in IPOTONICA	1 h a RT	1 h a RT
14	IPOTONICA 0,1% SD IP 1x 0,1% EDTA	3 h a RT AGITAZIONE	3 h a RT AGITAZIONE
15	PBS + IP	16 h a RT AGITAZIONE	16 h a RT AGITAZIONE
16	PBS 10 mM MgCl2 50 ug/mL BSA 50 U/mL DNase	3 h a 37°C	3 h a 37°C

	1 U/mL RNase				
17	PBS + IP	3 h a RT AGITAZIONE	3 h a RT AGITAZIONE		
18	10% ISOPROPANOLO in SALINA	24 h a 4°C AGITAZIONE	24 h a 4°C AGITAZIONE		
19	PBS	12 h a 4°C AGITAZIONE	12 h a 4°C AGITAZIONE		
20	congela a -80 °C				
		PROT 21	PROT 22	PROT 23	PROT 24
1	lava con SALINA [NaCl 0,9%]	1 h a RT			
2	congela	in H2O 12 h a -80°C	in H2O 24 h a -80°C	in H2O 48 h a -80°C	in H2O 72 h a -80°C
3	congela	in H2O 12 h a -196°C	in H2O 24 h a -196°C	in H2O 48 h a -196°C	in H2O 72 h a -196°C
4	121°C	20 min in H2O			
5	congela	in H2O 12 h a -196°C	in H2O 24 h a -196°C	in H2O 48 h a -196°C	in H2O 72 h a -196°C
6	121°C	20 min in H2O			
7	1% TRITON in IPOTONICA	24 h a 4°C AGITAZIONE			
8	IP 0,1% TRITON in IPOTONICA	16 h a 4°C AGITAZIONE			
9	10% ISOPROPANOLO in PBS	24 h a 4°C AGITAZIONE			
10	PBS	12 h a 4°C AGITAZIONE			
11	congela a -80 °C				

Tabella 3: protocolli di deproteinizzazione e decellularizzazione cui sono stati sottoposti i campioni di pericardio bovino

Al termine del processo di trattamento, su tutti i campioni è stato effettuato test MTT (come descritto in precedenza) al fine di valutare l'attività cellulare residua.

Test in vitro

Al fine di valutare le caratteristiche del pericardio e la capacità di adesione cellulare si è proceduto ad effettuare la semina di fibroblasti umani sul pericardio e successivamente è stata effettuata l'analisi morfologica.

I costrutti sono stati fissati in formalina per due ore e successivamente disidratati tramite la scala ascendente degli alcoli, inclusi in paraffina e tagliati in fette dallo spessore di 6 mm prima di essere sottoposti alla reazione di immunostochimica classica con ematossilina eosina e Weighert.

Inattivazione virale

I materiali trattati secondo i protocolli individuati sono stati messi in coltura a contatto con fibroblasti umani per una settimana. Al termine della quale si è provveduto ad estrarre l'RNA ed a effettuare analisi di espressione genica di presenza virale utilizzando i primer ed i controlli presenti nei kit (Tabella 4).

Influenza (A+B) Kit - RQ 50 det	Sistema completo per la determinazione di Influenza A e B mediante multiplex real time PCR
Human parainfluenza (1+3) Kit - RQ 50 det	Sistema completo per la rivelazione di Human Parainfluenza (tipo 1 e 3) mediante real time PCR
Human parainfluenza (2+4) Kit - RQ 50 det	Sistema completo per la rivelazione di Human Parainfluenza (tipo 2 e 4) mediante real time PCR
HSV (1+2) Kit - RQ 50 det	Sistema completo per la determinazione multiplex di HSV 1 e HSV 2 mediante Real Time PCR
Parvovirus B19 Kit - RQ 50 det.	Sistema completo per l'identificazione di Parvovirus B19 mediante Real Time PCR

Tabella 4: primer ed i controlli utilizzati per verificare l'inattivazione virale

Confronto con membrane del commercio

Parallelamente alla semina di fibroblasti umani sulle membrane trattate secondo i differenti protocolli, si è proceduto anche con la semina degli stessi fibroblasti su altre membrane presenti in commercio al fine di valutare dove la proliferazione fosse più favorita. Le membrane utilizzate elencate nella seguente Tabella 5.

Nome	Ditta	Origine	Descrizione prodotto
Bio-Gide	Geistlich	naturale	membrana bi-strato di collagene non reticolata (coll I e coll III)
Cytoplast TXT-200	Osteogenics Biomedical	naturale	membrana di collagene tipo I ricavata dal tendine di Achille bovino
DynaMatrix	Keystone dental	naturale	membrana extracellulare derivata dalla piccola sottomucosa intestinale (SIS - small intestinal submucosal) di suino
Mem-Lok	BioHorizons	naturale	membrana di collagene tipo I ricavata dal tendine di Achille bovino
OsseoGuard	Biomet	naturale	membrana di collagene tipo I ricavata dal tendine di Achille bovino

Tabella 5: membrane utilizzate per il confronto con il pericardio bovino

Dopo 1 giorno e 5 giorni dalla semina è stato effettuato il saggio MTT (come precedentemente descritto) su tutti i campioni.

In vivo

Al fine di valutare la biocompatibilità delle membrane trattate, si è proceduto con l'impianto in vivo nel sottocute di 4 ratti della membrana definita controllo ovvero quella non trattata e di due campioni ciascuno trattato secondo uno dei due protocolli rivelatisi migliori. In seguito ad anestesia totale, è stata rasata la pelle dell'addome del ratto, successivamente alle procedure di disinfezione, si è proceduto effettuando 3 differenti incisioni cutanee di circa 1 cm. Dopo aver disseccato per via smussa i tessuti sottocutanei, sono stati creati degli alloggiamenti in cui sono stati posizionati i campioni di pericardio bovino decellularizzato. Dei punti singoli con filo 4/0 hanno concluso l'intervento a 7 giorni e a 14 giorni gli animali sono stati sacrificati ed è stata condotta l'analisi istologica per analizzare la presenza di eventuale reazione infiammatoria.

Membrane sintetiche: polietilene glicole

L'idrogel PEG (Institut Straumann AG, Basilea, Svizzera) studiato è stato utilizzato come scaffold per le colture cellulari. L'idrogel era composto da due molecole di PEG (polietilene glicole); le singole molecole, disciolte nel loro buffer, sono state miscelate e poi solidificate entro 20-50 s a temperatura ambiente.

Le colture cellulari

Le ADSCs (cellule staminali adipose adulte) sono state estratte dal tessuto adiposo di 5 donne sane e 5 uomini sani (età: 21-36; BMI: 30- 38) sottoposti a interventi di chirurgia estetica in base alle linee guida della Clinica di Chirurgia Plastica presso l'Università di Padova. I tessuti adiposi sono stati digeriti e le cellule sono state isolate, espanse, e seminate seguendo esistenti protocolli (Gardin et al., 2012a).

Test di proliferazione

La proliferazione cellulare è stata valutata misurando il DNA contenuto nelle colture cellulari dopo 3, 7 e 15 giorni dalla semina in terreno senza alcun fattore di differenziazione. Il DNA è stato estratto utilizzando il Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germania), adatto anche per la purificazione del DNA totale dalle cellule. La concentrazione del DNA è stata rilevata misurando l'assorbanza a 260 nm in uno spettrofotometro. Il numero di cellule è stato quindi determinato da una curva standard (microgrammi di DNA in funzione del numero di cellule) generata dal DNA estratto da cellule contate. La curva standard era lineare nel range testato di 5-80 mg di DNA ($r = 0.99$).

Microscopia elettronica a scansione (SEM)

I campioni sono stati fissati con 2,5% di glutaraldeide in un tampone di cacodilato 0,1 M per un'ora prima dell'elaborazione o con esametildisilazano o con essiccazione al punto critico seguita da rivestimento in oro-palladio. Tutte le micrografie sono state ottenute a 20 kV su un microscopio JEOL 6360LV SEM (JEOL, Tokyo, Giappone). L'analisi SEM è stata condotta presso il Centro di Servizi Interdipartimentali C.U.G.A.S. (Università degli Studi di Padova).

Real time PCR

Per la sintesi del primo filamento di cDNA, 800 ng di RNA totale di ogni campione sono stati trascritti con l'M-MLV trascrittasi inversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguendo il protocollo del produttore. Primers umani sono stati selezionati per ogni gene bersaglio con il software Primer 3 (Tabella 6).

gene	FOR (5' - 3')	Rev (5' - 3')	Product Length (Bp)
osteonectin	TGCATGTGTCTTAGTCTTAGTCACC	GCTAACTTAGTGCTTACAGGAACCA	186
osteopontin	TGGAAAGCGAGGAGTTGAATGG	GCTCATTGCTCTCATCATTGGC	192
Collagen type i	TGAGCCAGCAGATCGAGA	ACCAGTCTCCATGTTGCAGA	178
CD31	TCCAGCCAACTTCACCATCC	TGGGAGAGCATTTCACATACGA	171
von willebrand Factor	GCTTCACTTACGTTCTGCATGA	CCTTCACTCGGACACACTCATTG	174
GAPDH	TCAACAGCGACACCCAC	GGGTCTCTCTTCTCTTGTG	203

Tabella 6: Primers umani selezionati per ogni gene bersaglio

Le PCR sono state effettuate utilizzando i primer disegnati ad una concentrazione di 300 Nm e FastStart SYBR Green Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) su un Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Le condizioni del ciclo termico sono state le seguenti: 15 min di denaturazione a 95° C; seguiti da 40 cicli di 15 s di denaturazione a 95°C; ricottura per 30 s a 60° C; e 20 s di allungamento a 72°C. I valori sono stati normalizzati per l'espressione del gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) come riferimento interno, la cui quantità non è cambiata nelle nostre condizioni sperimentali. Gli esperimenti sono stati eseguiti con 3 diverse preparazioni cellulari e ripetuti almeno 3 volte.

Array CGH (ibridazione genomica comparativa)

L'Array CGH è stata condotta utilizzando l'Agilent Human Genome CGH microarray 4x44K Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con una risoluzione media di 43 kb. L'etichettatura e l'ibridazione sono stati effettuati seguendo i protocolli Agilent. La panoramica grafica è ottenuta utilizzando il software di analisi CGH (v3.1) (Agilent Technologies).

Superfici implantari

Riguardo gli impianti dentali è stata studiata una nuova superficie implantare ionizzata e trattata con SC. Sono stati effettuati test *in vitro* e test PCR per indagare la tipologia di proteine che si sviluppava a contatto con la superficie.

Superfici implantari: test in-vitro

Per questo studio in vitro sono stati utilizzati due tipi di dischi di Titanio di diametro 5 mm e spessore 2 mm che riproducessero le caratteristiche della superficie implantare. Gli impianti con tale superficie sono già presenti in commercio (Implacil De Bortoli-Dental, São Paulo, Brasile).

- dischi *controllo* di Titanio: dischi di Titanio sabbiato con microparticelle di anidride Ti (TiO_2), con una dimensione media delle particelle di 180 micron, e mordenzati con acido maleico;
- dischi di Titanio *trattati*: dischi di Titanio sabbiati e mordenzati come sopra, poi trattati con ioni inorganici.

Tutti i dischi sono stati puliti e sterilizzati tramite raggi γ .

Test di Ames

Il test di Ames è un test genetico per l'analisi della genotossicità di una sostanza. Il principio del test si basa sulla valutazione della capacità di un sospetto mutageno di provocare la reversione di un carattere auxotrofo his- in un ceppo di batteri mutato (*Salmonella typhimurium*), rendendolo nuovamente capace di sopravvivere in un terreno privo di istidina. La maggior parte dei ceppi di *Salmonella* utilizzati nel test presentano anche altre mutazioni che alterano la permeabilità della parete (rfa-, elimina la catena polisaccaridica dei lipopolisaccaridi di membrana), consentendo l'ingresso nel batterio di mutageni anche di grosse dimensioni, o eliminano l'azione dei meccanismi di riparo del DNA (ΔuvrB , delezione del gene *uvrB*), permettendo in tal modo il mantenimento delle mutazioni ottenute.

Il test di Ames è stato eseguito con il Kit Mutagenesi completo per la *Salmonella* (Moltox, Molecular toxicology Inc, Boone, NC, USA) per valutare il potenziale mutageno dei dischi di Titanio controllo e trattati. Le condizioni di estrazione sono state a (24 ± 2) ore a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Tre repliche sono state eseguite per ciascun campione. Le piastre sono state incubate con batteri diversi estratti per 48 ore a 37°C , poi è stato contato il numero di colonie risultanti per piastra. L'interpretazione dei risultati è stata: negativo (non mutageno) se il numero di colonie risultava equivalente a quelle osservate con i controlli in bianco e negativi; positivo (mutageno) se il numero di colonie risultava equivalente a quelle osservate con controlli positivi.

Test di emolisi

Il test di emolisi è stato eseguito seguendo le pratiche standard stabilite nel protocollo ASTM F756, al fine di valutare la compatibilità del sangue sui dischi di Ti controllo e trattati (materiali di prova). Il sangue è stato ottenuto da tre conigli sani (razza New Zeland), unito e poi diluito in PBS ad una concentrazione di emoglobina totale di 10 ± 1 mg/mL. Un ml di sangue di coniglio diluito è stato aggiunto a 7 mL di estratti PBS. Per l'estrazione dei materiali di prova, sono stati preparati per tre volte porzioni di 2 gr di dischi di Ti e sono stati coperti con 10 ml di PBS. Per il controllo negativo, sono stati trattati tre volte 30 cm² di porzioni di polietilene ad alta densità (HDPE) e sono stati coperti con 10 ml di PBS. Per il controllo positivo, sono stati utilizzati 10 ml di acqua sterile per iniezione (SWFI). Le condizioni di estrazione erano a 50° C per 72 h per tutti i campioni. Ogni tubo è stato incubato per 3 ore a 37°C con inversioni periodiche. Dopo l'incubazione, le provette sono state centrifugate per 15 minuti a 800 giri/min. Ad 1 ml, aliquota del surnatante derivante dai materiali di prova, ai controlli negativi e positivi è stato aggiunto al 1 ml di reagente di Drabkin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e sono stati incubati a temperatura ambiente per 15 min. Il prodotto di reazione tra emoglobina e il reagente di Drabkin è un cianoderivato che è stato quantificato misurando l'assorbanza a 540 nm con un lettore di piastre (Victor 3 Perkin Elmer, Milano, Italia). L'indice di emolisi (HI) è stato quindi calcolato usando il valore medio di assorbanza (OD) per ciascun gruppo come segue:

$$\text{HI (\%)} = \frac{\text{OD (materiale di prova)} - \text{OD (controllo negativo)}}{\text{OD (controllo positivo)} - \text{OD (controllo negativo)}} \times 100.$$

Interpretazione dei risultati: non emolitico se il HI è stata del 2% o inferiore; HI emolitica se fosse superiore al 2%.

Culture cellulari

Sono state estratte le polpe dentali da denti molari sani di pazienti che avevano dato il loro consenso scritto. L'isolamento delle cellule staminali umane dalla polpa dentale (DPSCs) è stato eseguito secondo il nostro protocollo precedentemente pubblicato (Bressan et al., 2012). Brevemente, la polpa dentale è stata ottenuta grazie all'uso di un escavatore dentinale o di una curette di Gracey in seguito ad una frattura meccanica. La polpa è stata delicatamente rimossa e immersa per 1h a 37°C in una soluzione digerente, contenente 3 mg/mL di collagenasi di tipo I e 4

mg/mL di Phosphate Buffer Saline (PBS) (Lonza Srl, Milano, Italia). Una volta digerita, la soluzione è stata filtrata attraverso dei filtri cellulari di 70 micron (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada). Le cellule sono state poi coltivate con la soluzione Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza Srl) con l'aggiunta del 10% di siero fetale bovino (FBS) (Bidachem SpA, Milano, Italia) e 100 unità/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina. Alla fine, le cellule sono state raccolte mediante il trattamento con tripsina. Dopo il distacco dalle piastre di coltura, le cellule sono state seminate su dischi controllo e dischi trattati di titanio ad una densità di 5×10^3 cellule/dischi in una piastra a 96 pozzetti. Le cellule sono state coltivate secondo cDMEM a 37°C con 5% CO₂ fino a 25 giorni, e la soluzione è stata cambiata due volte a settimana.

Test MTT

Per determinare il tasso di proliferazione delle cellule coltivate sui dischi di titanio controllo e trattati, il test della citotossicità basato sul test del MTT (metil tiazolil-tetrazolium) è stato effettuato secondo il metodo di Denizot e Lang con piccole modifiche (Denizot and Lang, 1986). Il test si basa sulla vitalità mitocondriale, ossia solo mitocondri funzionali possono ossidare una soluzione MTT, dando come prodotto finale la tipica colorazione blu-violetto. Dopo la raccolta dal terreno di coltura, le cellule sono state incubate per 3 ore a 37°C in 1 ml di 0,5 mg/mL di soluzione di MTT preparata in soluzione PBS. Dopo la rimozione della soluzione di MTT con una pipetta, è stato aggiunto 0,5 ml di 10% dimetilsolfossido in isopropanolo (idMso) per 30 min a 37°C. Per ogni campione, i valori di assorbanza a 570 nm sono stati registrati per due volte in doppio in aliquote di 200 microlitri depositati in piastre da 96 pozzetti utilizzando un lettore di piastre (Victor 3 Perkin Elmer). Tutti i campioni sono stati esaminati dopo 15 e 25 giorni di coltura.

Letture al microscopio elettronico (SEM)

Per la lettura al microscopio elettronico (SEM), le DPSCs coltivate per 15 e 25 giorni sui dischi di titanio trattati e controllo sono state fissate in 2,5% glutaraldeide in 0.1 M di tampone cacodilato per 1 ora, poi progressivamente disidratate in etanolo. Sono stati esaminati anche i dischi di titanio di controllo e trattati senza cellule. L'analisi al SEM è stata condotta presso il Centro Servizi interdipartimentale "CUGAS" (Università di Padova, Italia).

Estrazione del RNA e sintesi della prima catena di cDNA

Dalle DPSCs seminate sui dischi controllo e trattati dopo 15 e 25 giorni di coltura è stato estratto l'RNA totale con il Mini Kit di RNeasy (Qiagen GmbH, Hilden, Germania). La qualità di RNA e la concentrazione dei campioni è stata misurata utilizzando la NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific).

Per la sintesi del primo filamento di sintesi del DNA, 200 ng di RNA totale di ogni campione sono stati trascritti inversamente con M-MLV trascrittasi inversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguendo il protocollo del produttore.

Real-time PCR

Primers umani sono stati selezionati per ogni gene bersaglio con software Primer 3 (Tabella 7). La PCR è stata effettuata utilizzando i primer disegnati ad una concentrazione di 300 nM e FastStart SYBR Green Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) su un Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Le condizioni di ciclo termico sono state le seguenti: 15 min di denaturazione a 95°C; seguiti da 40 cicli di denaturazione per 15 sec a 95°C; ricottura per 30 sec a 60°C; ed allungamento per 20 sec a 72°C. Le differenze di espressione genica sono state valutate con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl, 2001), utilizzando le DPSCs coltivate su dischi di titanio di controllo per 15 giorni come condizione di controllo. I valori sono stati normalizzati per l'espressione del gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) riferimento interno, la cui quantità non è cambiata nelle nostre condizioni sperimentali.

<i>gene symbol</i>	<i>forward primer (5'→3')</i>	<i>reverse primer (5'→3')</i>	<i>product length (bp)</i>
ALPL^a	GGCTTCTTCTTGCTGGTGGGA	CAAATGTGAAGACGTGGGAATGG	181
COL1A1^b	TGAGCCAGCAGATCGAGA	ACCAGTCTCCATGTTGCAGA	178
GAPDH^c	TCAACAGCGACACCCAC	GGGTCTCTCTTCTCCTTTGTG	203
OCN^d	GCAGCGAGGTAGTGAAGAGAC	AGCAGAGCGACACCCTA	193
ON^e	TGCATGTGTCTTAGTCTTAGTCACC	GCTAACTTAGTGCTTACAGGAACCA	183
OPN^f	TGGAAAGCGAGGAGTTGAATGG	GCTCATTGCTCTCATCATTGGC	192
RUNX2^g	AGCCTTACCAAACAACAACAG	CCATATGTCCTCTCAGCTCAGC	175

^a ALPL, alkaline phosphatase, liver/bone/kidney

^b COL1A1, collagen, type I, alpha 1

^c GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

^d OCN, osteocalcin

^e ON, osteonectin

^f OPN, osteopontin

^g RUNX2, runt-related transcription factor 2

Tabella 7: sequenze di primer umani utilizzati

Analisi del cariotipo

Dopo 25 giorni di coltura su dischi di Ti trattati, le cellule sono state esposte alla colchicina (Sigma-Aldrich) per 6 h, lavate in PBS, dissociate con tripsina (Lonza Srl) e centrifugate a 300 giri per 5 min. Il pellet è stato risospeso accuratamente ed incubato in 1% di citrato di sodio per 15 minuti a 37°C, poi fissato e steso su vetrini raffreddati a - 20°C. Le metafasi di cellule erano Q-bandate e cariotipate secondo le linee guida del Sistema Internazionale per la nomenclatura citogenetica umana. Sono state analizzate venticinque metafase per tre espansioni.

Array CGH (ibridazione genomica comparativa)

L'Array CGH è stata condotta utilizzando l'Agilent Human Genome CGH microarray 4x44K Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con una risoluzione media di 43 kb. L'etichettatura e l'ibridazione sono stati effettuati seguendo i protocolli Agilent. La panoramica grafica è ottenuta utilizzando il software di analisi CGH (v3.1) (Agilent Technologies).

Risultati

Biomateriali

Biomateriali naturali: test ex-vivo. Osso autologo

Sono stati raccolti campioni di osso autologo da 10 pazienti che sono stati processati sia per il saggio MTT che per la Real Time PCR.

I risultati dell'analisi PCR (Figura 10) dimostrano come non vi sia variabilità per i marcatori osteogenici: l'espressione di proteine quali osteopontina, osteocalcina, BMP2, TGF b1, RANKI e OPG non presenta variazioni significative al trascorrere del tempo in cui il campione viene mantenuto fuori dal cavo orale. Il valore del VEGF invece presenta un incremento di espressione sempre maggiore al trascorrere del tempo. Il VEGF è un fattore stimolante la crescita dell'endotelio vascolare che viene espresso quando sia richiesto un maggiore apporto di ossigeno e di nutrienti. L'incremento di questo mediatore può essere collegato ad una maggiore richiesta di ossigeno da parte delle cellule contenute all'interno del particolato prelevato. Situazione questa che indica uno stato di modificate richieste metaboliche delle cellule legate a cambiamenti dell'ambiente circostante.

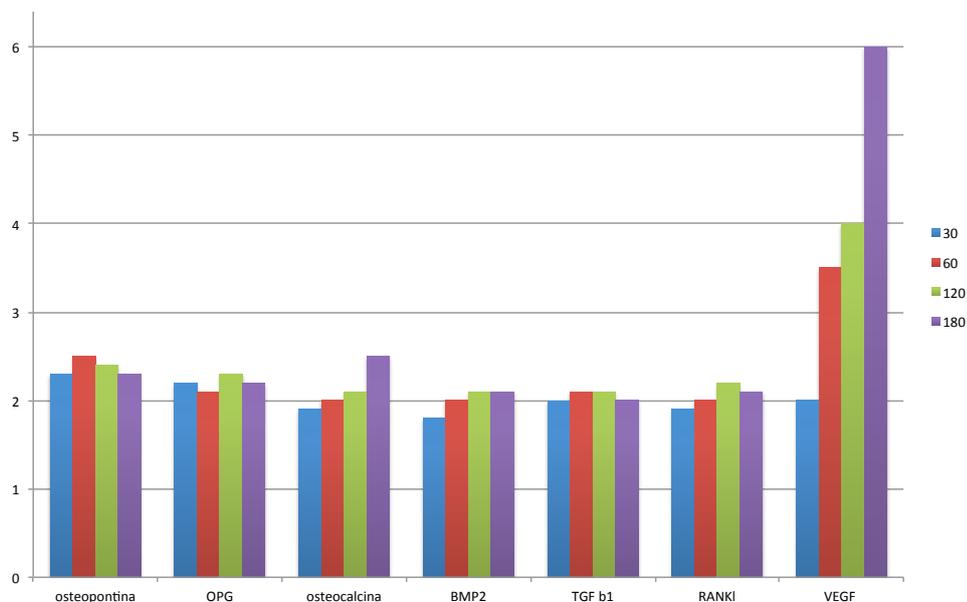


Figura 10: risultati dell'analisi PCR su campioni di osso autologo

Il saggio MTT (Figura 11) evidenzia come la vitalità cellulare rilevata a partire dall'attività dell'enzima succinato deidrogenasi mitocondriale, sia in costante calo già a partire dai primi 30 minuti di conservazione del particolato prelevato e mantenuto fuori dal cavo orale. Al trascorrere del tempo i valori rilevati con lo spettrofotometro calano ulteriormente fino ad attestarsi dopo 120 minuti di conservazione nella capsula di Petri, su cifre vicine allo zero. Anche questi risultati inducono a pensare che la cellula si trovi in una condizione di sofferenza dovuta alle mutate condizioni in cui si trova.

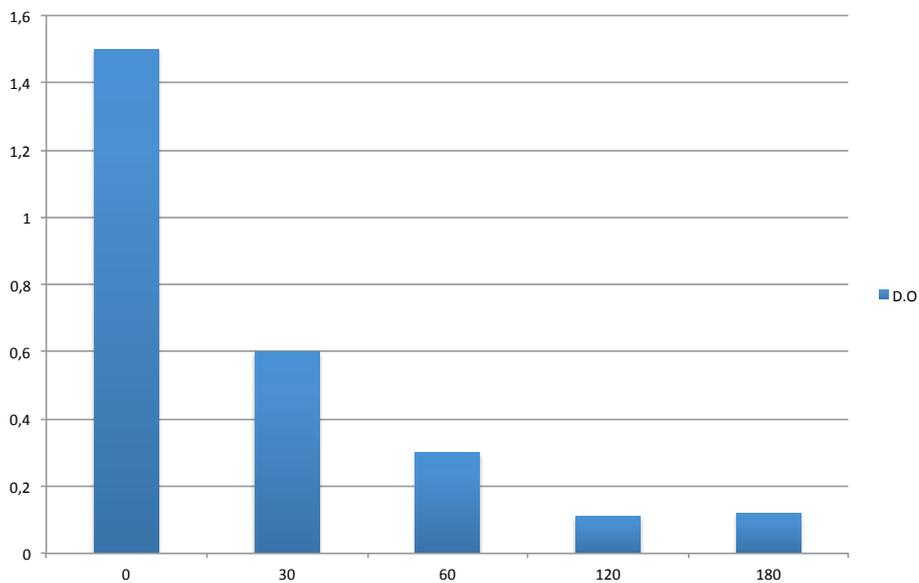


Figura 11: risultati del saggio MTT su campioni di osso autologo

La condizione di sofferenza è stata confermata anche dalla quantificazione della lattato deidrogenasi (LDH) (Figura 12), enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che è stata effettuata sui campioni a tre intervalli di tempo. Al trascorrere del tempo di conservazione del campione anche i valori di questo enzima calano a conferma che sia la via mitocondriale che quella citoplasmatica di produzione di energia diminuiscono la loro attività. Si è supposto quindi che la cellula si trovasse in uno stadio di morte programmata per apoptosi.

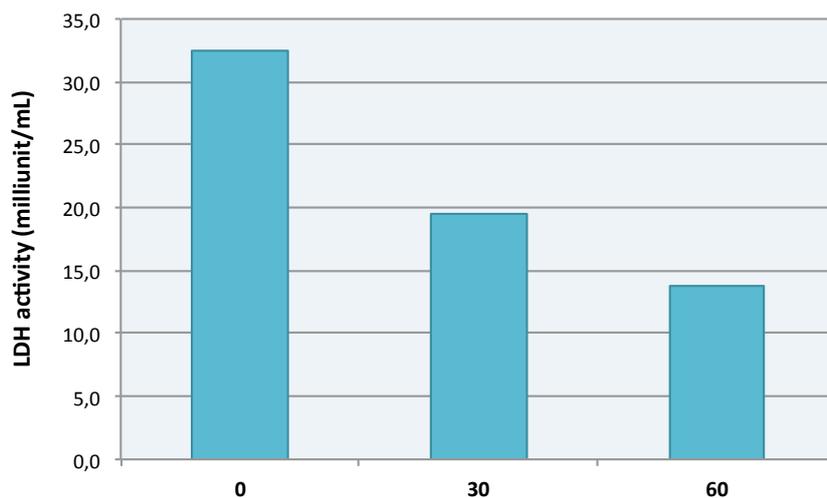


Figura 12: quantificazione della lattato deidrogenasi su campioni di osso autologo

E' stata quindi indagata l'espressione di geni pro apoptosi (Figura 13) come il Cell death inducing DFFA-like effector (CIDEA) e il Tumor necrosis factor (TNF) e quella di geni inibitori dell'apoptosi (Figura 14) quali il Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 e l'X-linked inhibitor of apoptosis. I risultati indicano come il CIDEA sia espresso 140 volte maggiormente a 120 minuti rispetto a 30 e il TNF sia circa 70 volte più espresso. Per quanto riguarda i geni anti apoptosi invece si è notata una sotto espressione di 20 volte per il ligante del TNF e di 30 volte per l'inibitore dell'apoptosi.

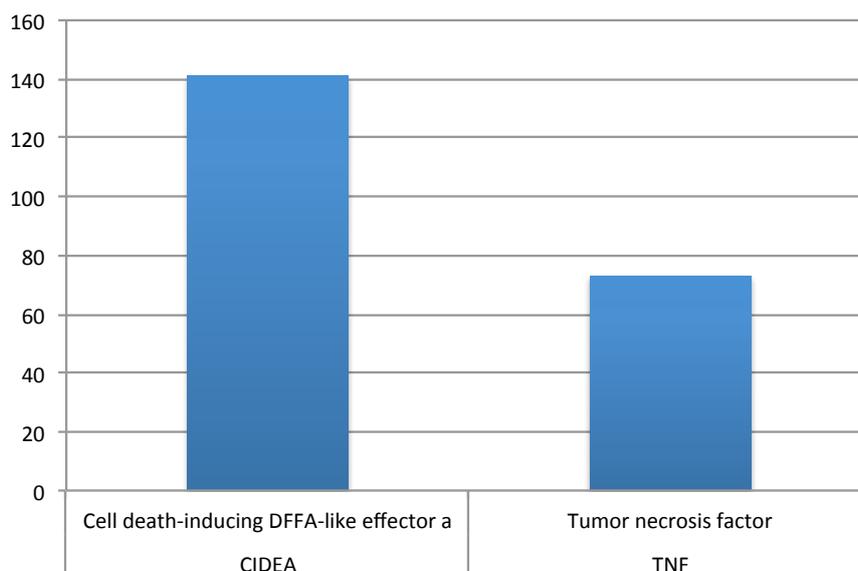


Figura 13: espressione di geni pro-apoptosi su campioni di osso autologo

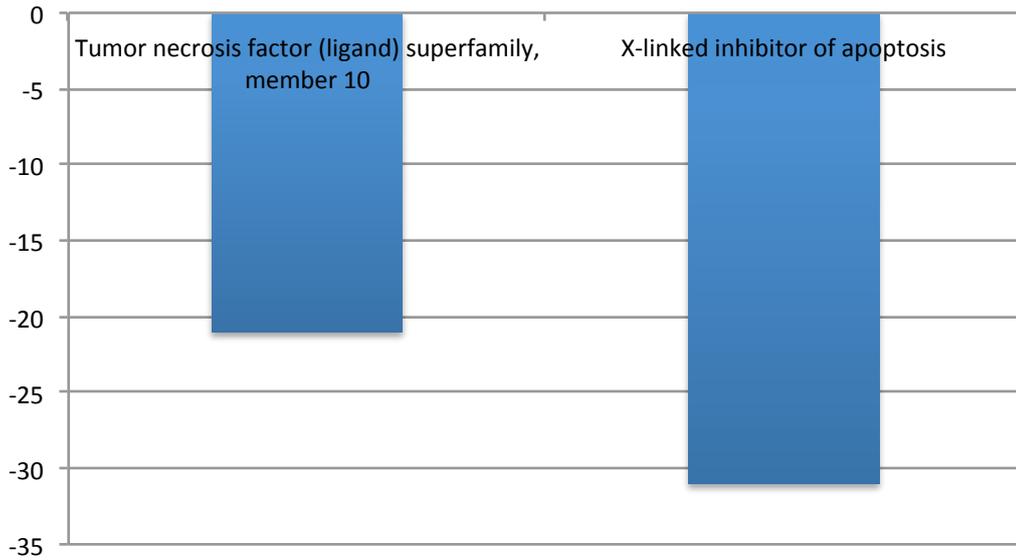


Figura 14: espressione di geni anti-apoptosi su campioni di osso autologo

I risultati hanno suggerito che la cellula ha intrapreso la via dell'apoptosi. Sapendo che in queste condizioni le cellule rilasciano numerosi mediatori, tra cui quelli dell'infiammazione, è stato quantificato il $TNF\alpha$ (Figura 15). I valori di questa citochina proinfiammatoria si sono riscontrati aumentare nel tempo.

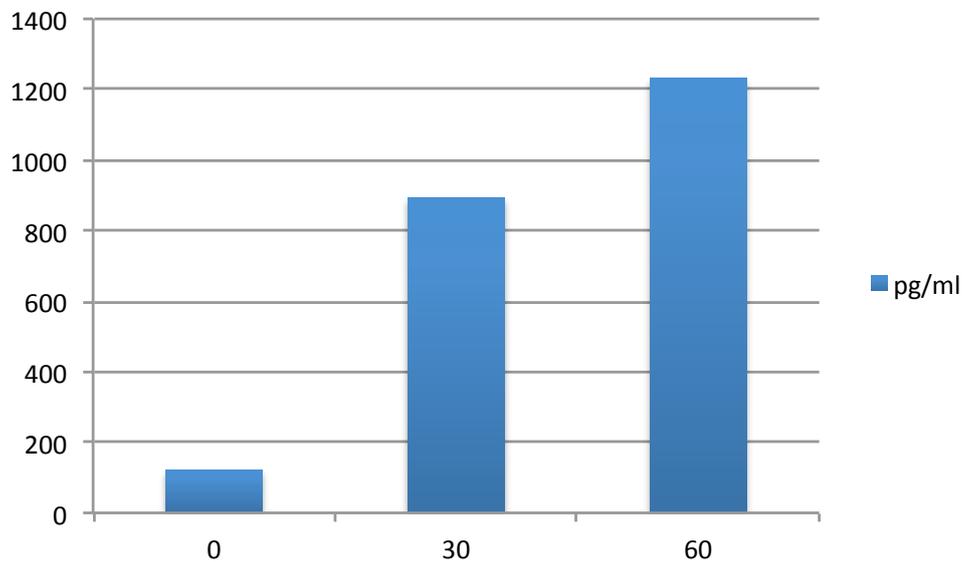


Figura 15: quantificazione di $TNF\alpha$ su campioni di osso autologo

I risultati dei test effettuati su campioni di osso autologo, che seguendo le normali procedure chirurgiche successivamente al prelievo sono destinati ad essere

reimpiantati nei siti riceventi, suggeriscono sia consigliabile un utilizzo più precoce possibile del particolato prelevato in modo da ridurre la permanenza fuori dal cavo orale ed evitare quindi che il sito ricevente venga a contatto con un biomateriale dalla scarsa vitalità e ricco di processi infiammatori in atto al suo interno.

Biomateriali naturali: test in-vivo. Rialzo seno mascellare su pecora

Gli eventi cellulari coinvolti nella rigenerazione ossea sono riassunti nella Tabella 8.

Days after implantation	PMN	Phagocytic cells	Non-phagocytic cells	Fibroblasts	Endothelial cells	Collagen type I
15 days without stem cells	-	-	-	+	+	+
30 days without stem cells	-	-	-	++	++	++
15 days with stem cells	-	-	-	++	++	++
30 days with stem cells	-	-	-	+++	+++	+++

Tabella 8: La presenza di cellule è stata indicata da non presente (-) a abbondantemente presente (+++)

In un normale tessuto rigenerato, i siti trattati con HA e con HA con cellule staminali, a 15 giorni non mostrano infiltrazione della popolazione delle cellule infiammatorie. Non ci sono cellule polimorfonucleate (cioè granulociti), fagociti (ovvero macrofagi e cellule giganti derivate dai monociti) e cellule non fagocitarie, plasmacellule e mastociti. Va notato che i numeri assoluti di PMN e cellule non fagocitarie sono inferiori che per le cellule fagocitarie. Sebbene anche i siti senza cellule staminali mostrino una presenza di fibroblasti, di cellule endoteliali e di collagene di tipo I, i siti trattati con cellule staminali mostrano un maggior numero di queste cellule. Al giorno 30 in presenza di scaffold di HA da solo è osservabile una moderata presenza di fibroblasti, cellule endoteliali e le fibre di collagene, mentre la più alta presenza di tutti i tipi di cellule e di una matrice extracellulare

ben strutturata si rileva in presenza di cellule staminali.

Al giorno 15, la presenza di uno stato infiammatorio, creato usando $TNF\alpha$, senza cellule staminali, ha mostrato un'alta infiltrazione di granulociti e macrofagi (Tabella 9).

Giorni dopo l'impianto	PMN	Cellule fagocitiche	Cellule non fagocitiche	Fibroblasti	Cellule endoteliali	Collagene di tipo I
15 giorni senza ADSCs	+++	+++	++	+	+	+
15 giorni con ADSCs	+++	+++	++	+	++	++
30 giorni senza ADSCs	++	++	++	++	++	+
30 giorni con ADSCs	+	+	+	+++	+++	+++

Tabella 9: HA scaffold trattati con $TNF\alpha$ (10 mM). La presenza di cellule è stata indicata da non presente (-) a abbondantemente presente (+++)

Gli scarsi fibroblasti, le cellule endoteliali e le fibre di collagene erano osservabili in qualsiasi sito. Il trattamento con cellule staminali in presenza di tessuto infiammato ha mostrato una grande presenza di cellule infiammatorie come granulociti e macrofagi, una scarsa presenza di fibroblasti, e una moderata quantità di cellule endoteliali e di fibre di collagene di tipo I. Al giorno 30, i siti senza cellule staminali hanno mostrato una moderata quantità di cellule polimorfiche nucleari (granulociti), di fagociti (macrofagi) e di alcune cellule non fagocitarie. C'è anche una moderata presenza di fibroblasti, cellule endoteliali e cellule di collagene di tipo I.

Al giorno 30, la risposta cellulare al trattamento con cellule staminali ha incluso una quantità significativa di cellule endoteliali, di cellule di collagene di tipo I e di fibroblasti. Erano scarsi, invece, le cellule nucleari polimorfiche, i fagociti e le cellule non fagocitarie. Le fibre di collagene erano presenti nel tessuto trattato con le cellule staminali.

Nel sito arricchito con le cellule staminali, i granuli di HA sono stati pienamente

integrati con le cellule simil-fibroblasti. Queste cellule sono in grado di produrre una buona matrice extracellulare costituita principalmente da collagene di tipo I, come rilevato dal colorante Alzan Mallory in blu (freccie nere). All'interno del preparato si trova anche una significativa presenza di vasi (freccie gialle). (Figura 16, Figura 17) La presenza di matrice extracellulare e di neo-angiogenesi è cruciale nel processo di guarigione.

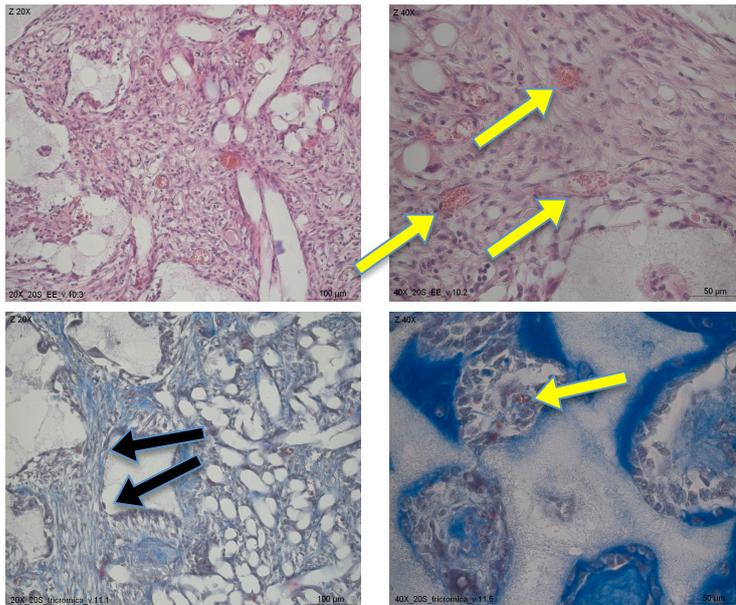


Figura 16: 15 giorni di guarigione. Sito con HA, TNF SC. Le immagini superiori sono colorate con EE, quelle inferiori con Alzan Mallory. Le frecce gialle indicano vasi, quelle nere fibroblasti. In EE, i punti scuri rappresentano cellule infiammatorie.

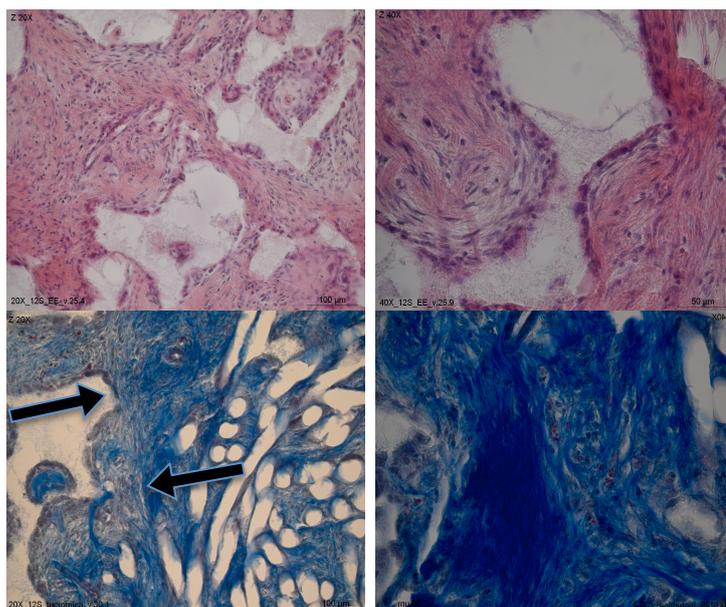


Figura 17: 30 giorni di guarigione. Sito con HA, TNF e SC. Le immagini superiori sono colorate con EE, le inferiori con Alzan Mallory. Le frecce nere indicano la ECM

Biomateriali naturali: test in-vivo. Difetto osseo peri-implantare su cane

Le cellule coinvolte nella rigenerazione ossea sono state analizzate con il blu di Stevenel e il rosso di alizarina. Queste colorazioni evidenziano in blu le fibre collagene e in rosso i tessuti mineralizzati (Figura 18). Le sezioni istologiche rappresentate in (Figura 19 e Figura 20) sono un esempio di guarigione a 30 giorni dopo inserimento della fixture implantare. Il sito è stato riempito con HA e cellule staminali. Si può notare in nero una porzione di fixture, in rosa l'HA, in rosso i tessuti mineralizzati e in blu le fibre collagene.



Figura 18: campione 30 giorni dopo l'inserimento dell'impianto. Questa preparazione è stata ottenuta con il blu di Stevenel e il rosso di alizarina. Si nota il gap marginale riempito di HA che si è creato intorno all'impianto.

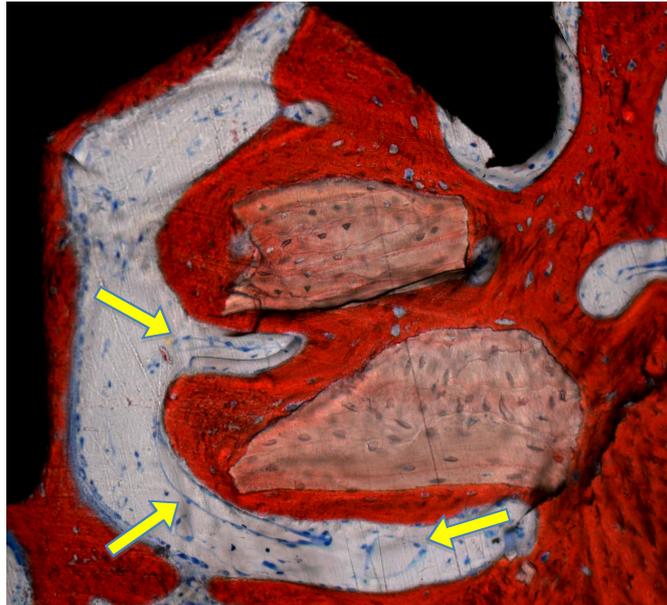


Figura 19: 30 giorni di guarigione. Il sito è stato rigenerato con HA con le cellule staminali. La colorazione indica la scaffold di HA, in rosso i tessuti mineralizzati e le fibre di collagene in blu. Le frecce gialle indicano i vasi.

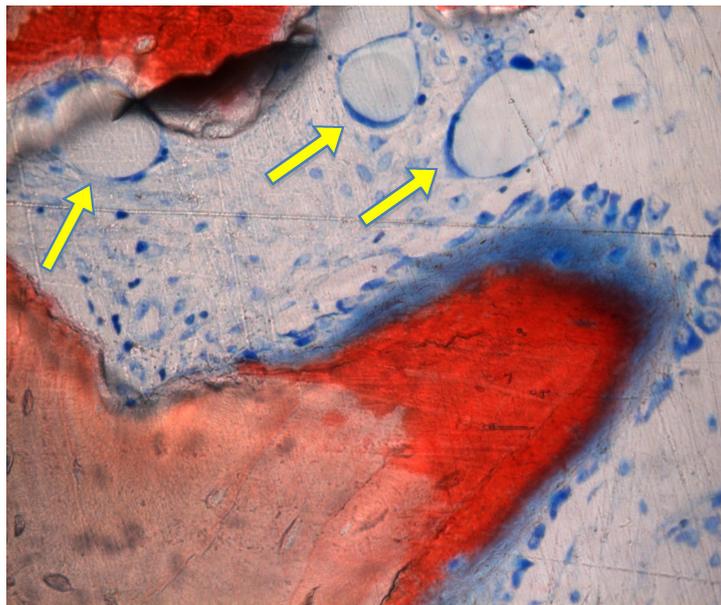


Figura 20: 30 giorni di guarigione. Il sito è stato rigenerato con HA e con le cellule staminali. La colorazione rosa indica lo scaffold di HA. In rosso i tessuti mineralizzati e in blu le fibre di collagene. Le frecce gialle indicano i vasi. Si noti la formazione di nuovo osso.

Nel sito arricchito con cellule staminali, i granuli di HA sono stati abbondantemente circondati da cellule simili a fibroblasti in grado di produrre una buona matrice extracellulare che consiste principalmente in collagene di tipo I e da molto tessuto mineralizzato. Non vi è presenza di infiltrato infiammatorio. Si può notare la presenza significativa di vasi sanguigni (frecce gialle) all'interno del

biomateriale. L'impianto dentale è ben integrato dato il buon contatto tra il nuovo osso e la superficie implantare. L'impianto dentale si può considerare integrato quando gode di una buona stabilità e quando vi è presente un grande quantità di osso all'interfaccia osso-impianto (BIC).

La Figura 20 mostra, con un ingrandimento maggiore (40x), la deposizione di nuova matrice ossea. Ci sono numerosi vasi che indicano un processo di neo-angiogenesi e si evidenzia l'HA in rosa a stretto contatto con gli osteoblasti in blu. La porzione rossa rappresenta il nuovo osso che viene prodotto dagli osteoblasti direttamente a contatto con la superficie dell'HA.

A 30 giorni dall'intervento entrambi i siti, con o senza le cellule staminali non mostrano PMN (cioè granulociti), fagociti (che comprendono macrofagi e cellule giganti di derivazione monocitaria) e le cellule non fagocitiche, plasmacellule e mastociti. Si può notare la presenza significativamente minore di PMN e cellule non fagocitiche rispetto alle cellule fagocitiche.

I siti senza cellule staminali mostrano una scarsa quantità di fibroblasti, cellule endoteliali e collagene di tipo I. Anche la formazione di nuovo osso è scarsa. Nei siti trattati con HA e con cellule staminali la quantità di cellule endoteliali e di collagene di tipo I è maggiore e la formazione di nuovo osso è più evidente (Tabella 10).

30 Days after implantation	PMNs	Phagocytic cells	Non-phagocytic cells	Fibroblasts	Endothelial cells	Collagen type I	New bone
NO stem cells	-	-	-	+	+	+	+
SI stem cells	-	-	-	+	++	++	++

Tabella 10: La presenza di cellule è stata indicata da non presente (-) a abbondantemente presente (+++)

Biomateriali naturali: femore bovino

L'osso analizzato è stato prelevato dall'epifisi del femore bovino e quindi risulta composto quasi esclusivamente da tessuto osseo spugnoso. Si sono ricavate manualmente delle sezioni di media grandezza adeguate agli strumenti a disposizione e i frammenti così ottenuti sono stati sottoposti a protocollo di decellularizzazione.

Test di Proliferazione: MTT

Il test di proliferazione MTT è stato eseguito su quattro blocchetti di osso controllo ed altrettanti di osso trattato al fine di ottenere dei dati significativi. Lo scopo è quello di valutare la presenza di cellule vive sul materiale trattato, trattandosi di un protocollo di decellularizzazione ci si aspetta che dopo il trattamento il materiale biologico presenti un'attività cellulare nulla. L'MTT è un saggio che consiste in un test colorimetrico (Figura 21).

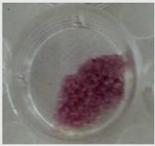
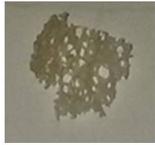
CAMPIONE \ PROCESSO	F1	F2	F3	F4
CONTROLLO				
TRATTATO				

Figura 21: Sezioni di osso controllo e trattato sottoposte a test MTT prima dell'aggiunta dell'estrante

Oltre alla differenza di colorazione tra i campioni trattati e i campioni controllo si può anche notare una differenza tra le sezioni F1, F2, F3 e F4. Quest'ultima è stata prelevata in una zona del femore più prossima all' osso compatto, il quale, anche se istologicamente identico all'osso spugnoso, è meno ricco di vasi e cellule. Inoltre è costituito da tessuto più densamente organizzato e bisogna considerare la difficoltà del colorante di penetrare all'interno del tessuto. Questo spiega perché F4 nel controllo si presenta colorato solo alle estremità, con la possibilità che si tratti di sezioni di canalicoli che mettono in comunicazione i vari osteoni, e quindi una zona ricca di vasi. Le sezioni F1, F2 e F3, sono composte da osso spugnoso e per questo risultano cariche di cellule vitali in quanto più prossimali rispetto a F4 al midollo osseo e a cellule attive, nonché alla facilità del colorante di penetrare nella zona trabecolare.

Per i tre campioni F1, F2 ed F3 trattati con protocollo si può notare l'assenza di

cellule vitali. La differenza di colorazione con i campioni controllo è chiara, il loro colore bianco denota la mancata formazione del complesso colorato e quindi la mancanza di cellule attive. Mentre per F4 la differenza tra il campione trattato e il campione controllo non è così evidente.

Un valore preciso si ottiene aggiungendo l'estrattore che solubilizza il colorante e permette di ottenere una soluzione variamente colorata quantificabile tramite spettrofotometro (Figura 22).

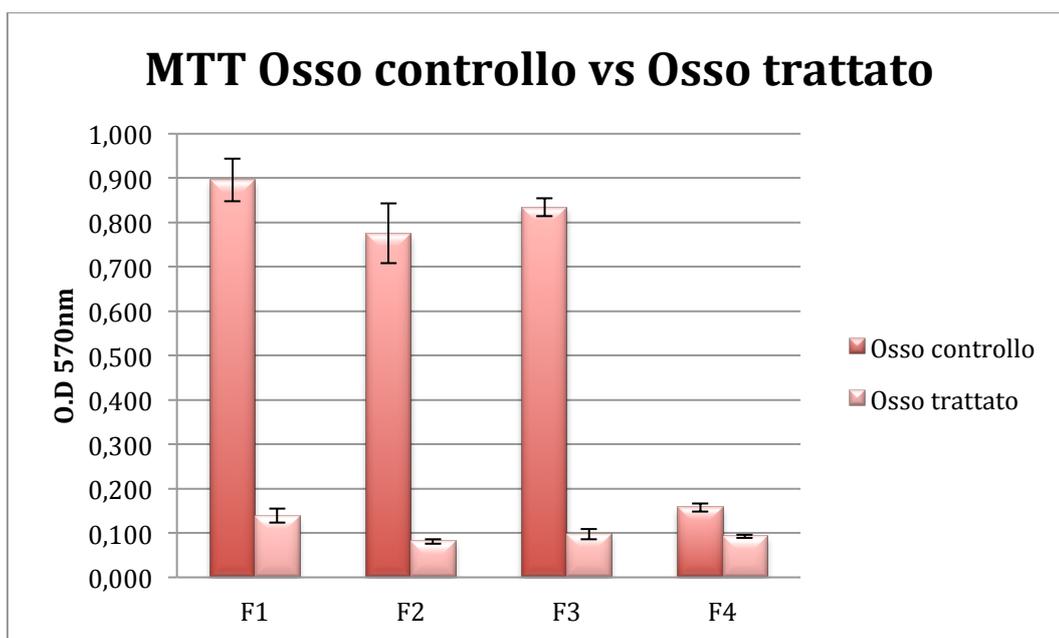


Figura 22: Grafico elaborato sui valori ottenuti dal test di MTT

Dal grafico si può apprezzare la differenza della vitalità cellulare tra campioni di osso trattati con protocollo di decellularizzazione (barre chiare) rispetto all'osso non trattato (barre scure). Analizzando questo grafico si è notato anche il differente comportamento tra le sezioni di osso. Mentre nel caso di F1, F2 e F3 la differenza nell'altezza dei picchi è notevole tra osso controllo e osso trattato, questa è meno marcata per F4. La ragione di tale comportamento, come accennato in precedenza, può essere dovuta ad una componente cellulare meno densamente rappresentata e da una difficoltà del colorante di penetrare tra le fibre del tessuto. Questo però porta ad una mancata certezza della riuscita del protocollo di decellularizzazione; di conseguenza, i blocchetti di osso trattato con prevalenza di tessuto osseo compatto sono stati esclusi dallo studio, concentrandosi su blocchetti costituiti da osso spugnoso.

Valutazione Della Biocompatibilità Dell'Osso Decellularizzato

Valutata l'efficacia del protocollo di decellularizzazione e la presenza delle proteine fondamentali della matrice ossea si è testata la capacità del biomateriale di far vivere e proliferare le cellule.

Per questo test i blocchetti di osso decellularizzato sono stati ridotti manualmente in piccoli granuli, al fine di ottenere un materiale omogeneo e facilmente maneggiabile. Ridurre le sezioni ad una granulometria più piccola permette anche di aumentare la superficie di contatto tra cellule e biomateriale, creando così un ambiente più ottimale per le cellule. Questa situazione consente di valutare al meglio le proprietà dello scaffold elaborato, sia per quanto riguarda la capacità di proliferazione sia quella di differenziazione.

L'analisi è stata condotta seminando MSC derivanti da tessuto adiposo, ADSC, sul biomateriale in terreno non differenziativo. Le cellule sono state lasciate in coltura per un tempo totale di 21 giorni valutando la proliferazione cellulare mediante test MTT a 4 tempi: 3, 7, 14 e 21 giorni. Dalla quantificazione allo spettrofotometro si è potuta ricavare una visione globale sulla proliferazione delle cellule sul biomateriale (Figura 23).

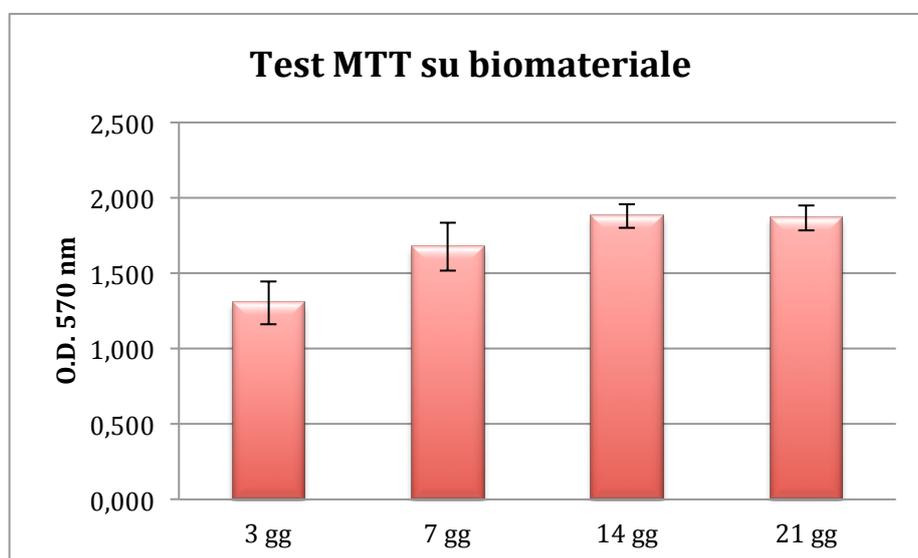


Figura 23: Grafico ottenuto dal test di MTT per ADSC in coltura su biomateriale a quattro differenti tempi

Come si può evincere dal grafico le cellule seminate aderiscono al biomateriale permettendone la sopravvivenza e la proliferazione. Questo significa che siamo in

presenza di cellule vive e in proliferazione e quindi che il biomateriale si dimostra essere un substrato favorevole alla crescita cellulare. L'attività proliferativa, anche se in maniera meno marcata, è visibile tra i 7 e i 14 giorni indice che le cellule possiedono ancora spazio per potersi distribuire sul substrato. La crescita cellulare subisce un arresto tra i 14 e i 21 giorni questo in parte dovuto alla difficoltà di coltivare in vitro cellule per un lungo periodo di tempo.

Valutazione Dell'Osteoinduttività Del Biomateriale

Dopo aver verificato la capacità del biomateriale di far vivere e proliferare le cellule seminate sulla sua superficie si è valutata la sua osteoinduttività, ovvero la capacità di indurre il differenziamento cellulare in senso osteoblastico

A tale scopo, sono stati condotti esperimenti in cui ADSC sono state seminate e coltivate sul biomateriale per 21 giorni in terreno non differenziativo. Al termine dei 21 giorni, si è effettuata un'analisi Real-Time PCR per valutare l'espressione dei geni codificanti proteine collagenose e noncollagenose da parte delle ADSC in coltura sul biomateriale. I dati raccolti sono rappresentati in Figura 24.

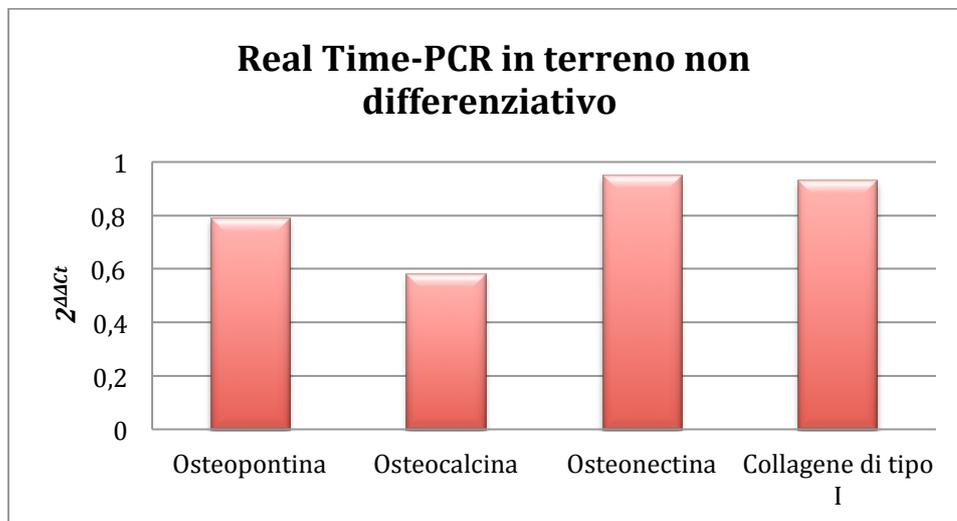


Figura 24: Grafico ottenuto elaborando i dati ottenuti dal test Real-Time PCR

Grazie a questa indagine molecolare si è valutata l'espressione genica di mRNA codificanti le proteine coinvolte nel processo di ossificazione, quali l'osteopontina, l'osteocalcina, l'osteonectina e il collagene di tipo I, principale componente della matrice extracellulare ossea.

Si può notare una differenziazione verso il fenotipo osteoblastico in quanto sono

espressi i marker ossei. L'espressione dell'insieme di queste diverse proteine caratterizzano il fenotipo dell'osso, ed è indotta durante la differenziazione degli osteoblasti in modo graduale evocata da molti fattori regolatori (Rodan and Noda, 1991).

Abbiamo una buona espressione dell'osteonectina. Questa proteina media i legami degli osteoblasti con la componente collagenosa della matrice extracellulare dell'osso svolgendo anche un ruolo nella differenziazione degli osteoblasti.

Anche il collagene di tipo I è espresso; esso è prodotto dagli osteoblasti ed è proteina costitutiva della matrice extracellulare fondamentale per il mantenimento della struttura dell'osso e la comunicazione tra le varie tipologie cellulari.

Sembra che l'espressione del collagene I si abbia già a stadi precoci della differenziazione in osteoblasti, mentre osteopontina e osteocalcina appaiono in fasi successive (Rodan and Noda, 1991). L'osteopontina è leggermente meno espressa rispetto al collagene di tipo I e all'osteonectina, essa è un'altra proteina fondamentale ma implicata nel metabolismo degli osteociti e nell'organizzazione di questi durante la fase di riassorbimento cellulare. Tuttavia in letteratura è stato riportato un altro importante ruolo di questa proteina, la creazione di nuovi vasi (angiogenesi) nel tessuto osseo neoformato. La sua espressione, come appare nel grafico (Figura 24), non è marginale. Trovandoci nelle prime fasi di deposizione di tessuto osseo è possibile pensare che l'osteopontina, in questa situazione, svolga un ruolo marginale nella coordinazione del riassorbimento osseo e nella comunicazione tra osteociti; fornendo invece un valido aiuto nella formazione di nuovi vasi e permettendo la vascolarizzazione del tessuto neo generato, requisito fondamentale sia per la formazione che per la sopravvivenza del tessuto.

Meno espressa rispetto agli altri marker considerati è l'osteocalcina. Questa proteina è coinvolta nella fase di mineralizzazione dell'osso con il ruolo prevalente di sequestrare ioni calcio dal sangue e stimolare la differenziazione degli osteoclasti in fenotipo attivo per il rimodellamento osseo. In questo caso è meno espressa rispetto agli altri ma ciò può essere dovuto al fatto che ci si trova di fronte ad una situazione di accrescimento dell'osso in una fase iniziale e in vitro dove la quantità di ioni Ca^{2+} è limitata e quindi la produzione di questa proteina adibita a legare il calcio è meno marcata.

I marker analizzati sono prodotti in maniera massiccia dagli osteoblasti e rintracciare la loro espressione da parte delle cellule, inizialmente indifferenziate e

non capaci di produrre tali proteine, permette di riconoscere il cambiamento fenotipico delle ADSC in osteoblasti.

Analisi Istologica

L'analisi istologica permette di osservare e studiare la morfologia di un tessuto, può essere eseguita mediante diverse colorazioni che mettono in risalto differenti elementi del tessuto a seconda dell'oggetto di interesse. Per queste analisi si sono scelte due colorazioni Ematossilina/Eosina (E/E) e Tricromica di Masson. Mediante colorazione E/E si riesce ad avere una visione complessiva sulla morfologia della biopsia riuscendo a capire come si comporta il materiale inserito nell'organismo e valutare la risposta di quest'ultimo al materiale estraneo. È possibile osservare le interazioni che intercorrono tra questi due elementi prendendo visione anche di come le cellule dell'ospite si comportano nei confronti del biomateriale.

La Tricromica di Masson, invece, permette di ottenere informazioni più specifiche, essa evidenzia elementi più precisi del tessuto rispetto alla colorazione E/E permettendo di colorare le fibre di collagene. Essa, grazie alla proprietà dei coloranti impiegati di virare il loro colore in base al pH, permette di individuare uno stesso elemento ma in fasi differenti. Ad esempio, tale colorazione è in grado di conferire alle fibre di collagene della matrice extracellulare deposte dai fibroblasti ovini una colorazione più tenue rispetto a quelle depositate dagli osteoblasti, oppure la capacità di distinguere tra fibre appena deposte e fibre in via di mineralizzazione.

Le sezioni degli innesti a 15 e 30 giorni consentono di valutare dove il biomateriale è stato posizionato rispetto all'osso mascellare ovino ed osservare come si presenta il biomateriale. L'osso bovino decellularizzato prima dell'inserimento nell'animale, come accennato in precedenza, è stato ridotto in dimensioni opportune. Il rationale nel ridurre in granuli il biomateriale sta, oltre che alla praticità nel maneggiamento, anche all'evidenza che l'efficienza nella rigenerazione aumenta con l'aumentare della superficie di contatto biomateriale/cellule (Gardin et al., 2012b). Poiché un aumento della superficie di contatto è inversamente proporzionale alla dimensione dei granuli, l'osso decellularizzato è stato ridotto manualmente in grani di dimensioni ridotte.

Ad una prima analisi di queste sezioni si può cogliere che nel campione a 30 giorni

è presente un'integrazione migliore rispetto a quello a 15 giorni. Al fine di avere una panoramica più completa e comprendere meglio la struttura delle varie sezioni può essere utile procedere analizzando un campione alla volta confrontando parallelamente le due colorazioni, focalizzando l'analisi su zone delle sezioni significative per la valutazione dell'integrazione del biomateriale con l'ospite e della capacità rigenerativa.

Innesto di osso bovino decellularizzato in seno mascellare di pecora a 15 giorni

Dopo aver valutato la dislocazione nel complesso del materiale si può procedere nell'analizzare le sezioni a diversi ingrandimenti più in dettaglio (Figure 25 e 26).

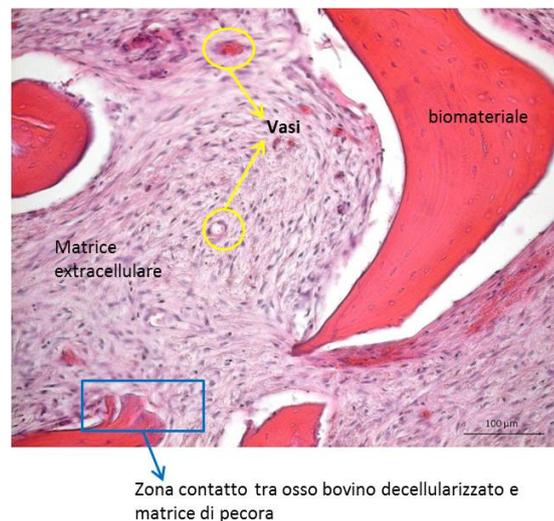


Figura 25: Innesto di osso bovino decellularizzato all'interno del seno di pecora 15 giorni (20x) colorazione E/E

Zona di interazione tra biomateriale e matrice extracellulare di pecora

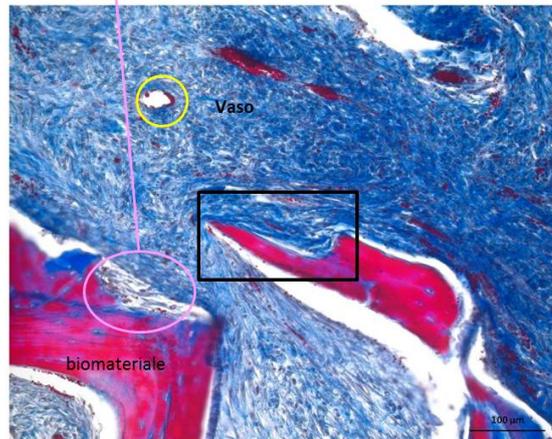


Figura 26: Innesto di osso bovino decellularizzato all'interno del seno di pecora a 15 giorni (20x) colorazione con Tricromica di Masson

Grazie a queste immagini ad ingrandimenti più grandi (20x) si nota come le zone di interazione tra biomateriale e ambiente circostante siano scarse. Si sono individuate alcune zone interessate da questo fenomeno.

Nell'ingrandimento della Figura 26 (Figura27) si può apprezzare una zona di inizio interazione a livello della superficie di contatto tra biomateriale e tessuto circostante.

Ingrandimento del riquadro nero

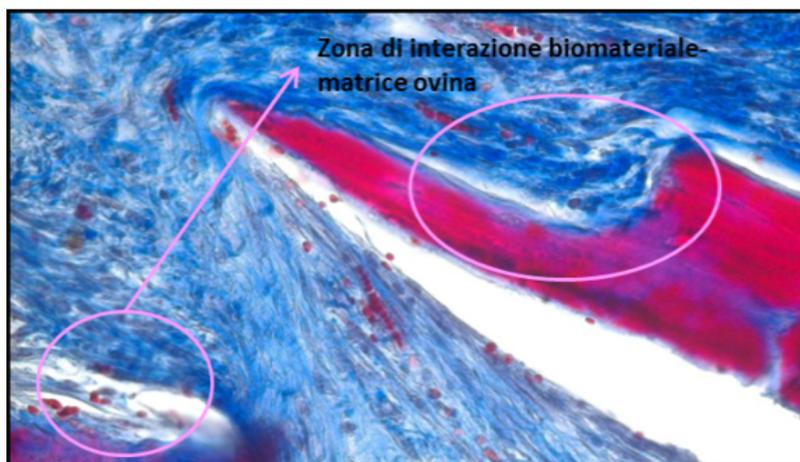


Figura 27: Ingrandimento del quadrato presente in figura 26 colorazione con Tricromica di Masson

Le immagini permettono di individuare la presenza di alcuni vasi intorno al biomateriale, requisito fondamentale per la formazione di nuovo osso in quanto

garantisce, insieme al nutrimento e all'eliminazione delle sostanze di rifiuto, anche la migrazione delle cellule osteoprogenitrici verso il biomateriale e il loro successivo differenziamento indotto da quest'ultimo. La vascolarizzazione permette anche il movimento degli osteoblasti già differenziati che arrivano sulla superficie di contatto per deporre nuova matrice.

Le sezioni ottenute dal campione a 15 giorni mostrano una situazione di innesto ancora nelle sue prime fasi. Nello stesso campione possiamo notare due zone con un comportamento differente da parte dell'ospite, probabilmente dovuto alle diverse dimensioni del biomateriale. In zone dove il materiale di innesto presenta dimensioni maggiori l'immagine mostra una situazione ancora di distacco tra innesto e ambiente circostante mentre in zone dove il biomateriale è di dimensioni più contenute e probabilmente di spessore minore si può assistere a fasi di adesione degli osteoblasti all'innesto; questo è visibile ad ingrandimenti maggiori (Figura 28).

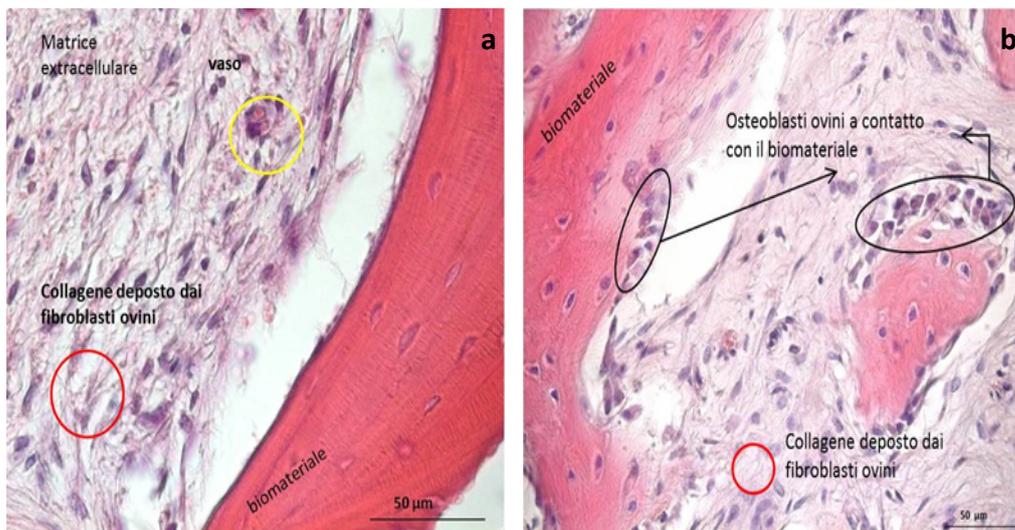


Figura 28: Innesto di osso bovino decellularizzato all'interno del seno di pecora a 15 giorni (40x) colorazione E/E; (a) sezione con biomateriale più grossolano, (b) sezione con biomateriale strutturato più finemente

Possiamo notare un inizio di vascolarizzazione attorno al biomateriale inserito. Nella Figura 28a vediamo che la superficie del biomateriale è priva di colonizzazione da parte degli osteoblasti mentre nella Figura 28b possiamo notare un avvicinamento da parte delle cellule specializzate nella deposizione di tessuto osseo sulla superficie di contatto biomateriale/tessuto ovino. Considerazioni simili si possono fare analizzando le immagini in Figura 29 ottenute con la Tricromica di

Masson.

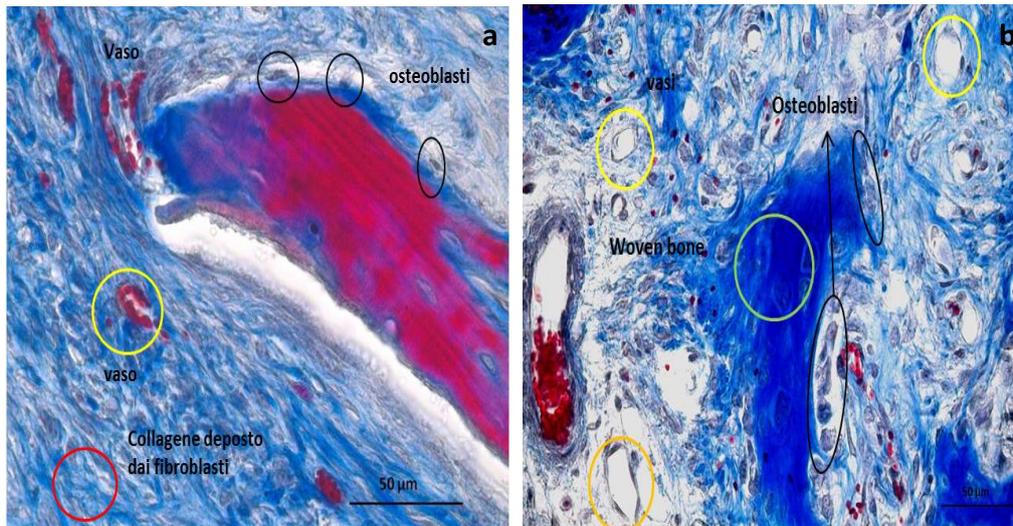


Figura 29: Innesto di osso bovino decellularizzato all'interno del seno di pecora a 15 giorni (40x) colorazione Tricromica di Masson; (a) sezione con biomateriale più grossolano, (b) sezione con biomateriale strutturato più finemente

Si riesce ad apprezzare la formazione dei primi vasi in prossimità dell'innesto. In entrambe le sezioni si può vedere l'avvicinamento degli osteoblasti verso la superficie di contatto biomateriale/tessuto ospite. Nella Figura 29a si nota come sulla superficie di contatto tra biomateriale/tessuto ospite siano presenti pochi osteoblasti. La struttura interna del materiale di innesto è povera di nuclei e questo potrebbe spiegare la scarsa deposizione di fibre di collagene. La deposizione di matrice neoformata si può leggermente apprezzare all'estremità dell'innesto attorno ai nuclei degli osteoblasti, questo potrebbe essere indice che ci si trova nella fase iniziale di rigenerazione ossea. Nella Figura 29b sembra che gli osteoblasti si siano già inseriti nella struttura del biomateriale e abbiano già iniziato a deporre fibre di collagene (di colore blu acceso) visibilmente differenti rispetto alle fibre di collagene deposte dai fibroblasti ovini (blu più tenue). Questa differenza di comportamento da parte dei tessuti dell'ospite potrebbe risiedere nella diversa consistenza delle sezioni di biomateriale.

Le immagini appena analizzate suggerirebbero una scarsa interazione tra biomateriale ed ospite con la mancata rigenerazione ossea guidata. Ciò potrebbe essere dovuto ad un contatto troppo breve, in termini temporali, tra biomateriale ed ambiente circostante. Infatti per poter assistere alla deposizione di nuova matrice ossea è necessario un lasso di tempo maggiore rispetto a 15 giorni. Come

visto in precedenza, mediante l'analisi in vitro delle capacità osteoinduttive del biomateriale, le cellule indifferenziate iniziano ad esprimere i marker ossei dopo 21 giorni a contatto con il biomateriale. La situazione qui è più complessa e gli stimoli di differenziazione verso il fenotipo osteoblastico possono essere maggiori ma comunque è richiesto un lasso di tempo adeguato per poter assistere alla deposizione di nuova matrice extracellulare composta prevalentemente da collagene che poi verrà mineralizzata (woven bone) per trasformarsi in osso maturo.

Interessante è la possibilità di apprezzare nell'analisi della biopsia a 15 giorni, oltre agli stadi iniziali di interazione biomateriale/tessuto ospite, il mancato sviluppo di una reazione infiammatoria da parte dell'animale ospite. L'infiammazione può essere una delle cause più frequenti di mancata rigenerazione ossea e più in generale un problema che può colpire l'uso di biomateriali.

Innesto di osso bovino decellularizzato in seno mascellare di pecora a 30 giorni

Le sezioni ad ingrandimenti più piccoli avevano mostrato per le biopsie a 30 giorni delle differenze rispetto a quelle a 15 giorni, delineando una situazione molto più ordinata e mostrando un'integrazione apparentemente meglio riuscita. Un'analisi più in dettaglio di queste biopsie, confrontando le sezioni a diversi ingrandimenti e colorate mediante le due colorazioni istologiche scelte, permetterà di mettere in luce i risultati ottenuti.

Le immagini acquisite con colorazione E/E permettono di apprezzare una buona vascolarizzazione, infatti è possibile notare la presenza di vasi più o meno grandi in prossimità del biomateriale (Figura 30).

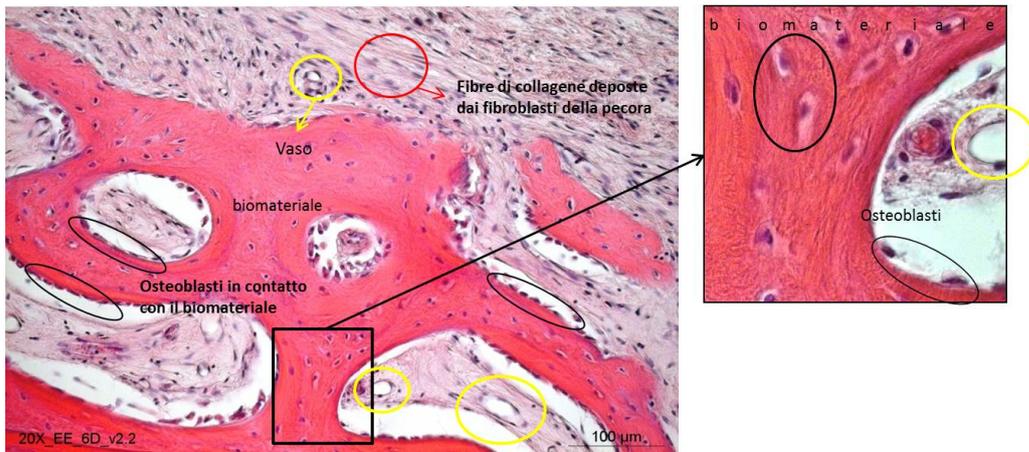
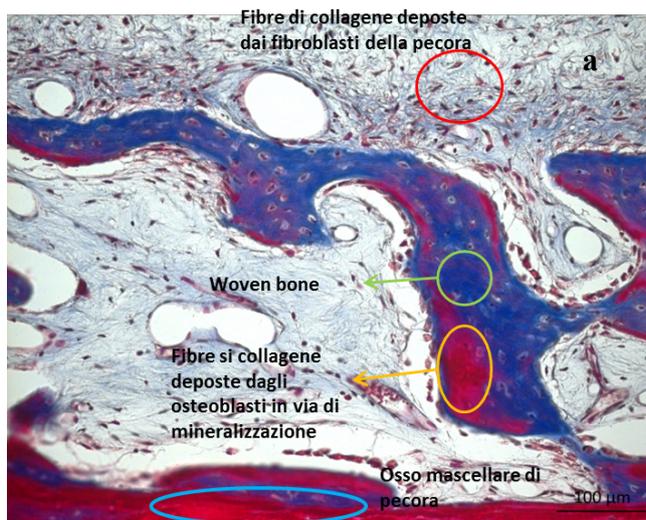


Figura 30: Innesto di osso bovino decellularizzato all'interno del seno di pecora a 30 giorni (20x) colorazione E/E

Significativa è anche la presenza di molti osteoblasti sulla superficie di contatto tra innesto/tessuto ospite, indice sia di una buona integrazione tra l'ospite e l'innesto sia di una rigenerazione ossea in corso.

Nella Figura 30 a differenza della Figura 25, si notano molti più nuclei all'interno del biomateriale; questo significa che gli osteoblasti sono penetrati nei pori del biomateriale e hanno iniziato a deporre nuova matrice e in essa sono rimasti intrappolati. La deposizione di nuova matrice può essere apprezzata nelle sezioni colorate tramite Tricromica di Masson (Figura 31).



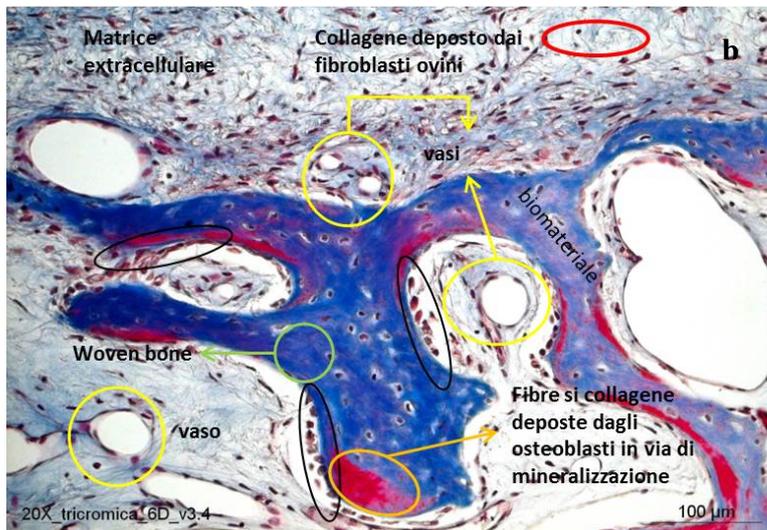


Figura 31: Innesto di osso bovino decellularizzato all'interno del seno di pecora a 30 giorni (20x) colorazione con Tricromica di Masson; le due immagini (a) e (b) rappresentano la stessa sezione, nella (b) è possibile apprezzare l'osso mascellare di pecora maturo

La deposizione di collagene da parte degli osteoblasti contribuisce alla formazione di quello che viene definito woven bone, cioè una struttura di collagene molto densa destinata in una fase successiva ad essere mineralizzata diventando così osso maturo. Tramite la Tricromica è possibile individuare la differenza tra woven bone (blu scuro) e osso maturo (rosso). Si nota che lo strato di osso rosso nella zona inferiore della Figura 31b corrisponde all'osso mascellare di pecora ed è il risultato che si vuole raggiungere con il processo di rigenerazione, in quanto si punta alla formazione di osso maturo. Nella zona del biomateriale si possono apprezzare alcune zone colorate con la stessa tonalità dell'osso ovino di riferimento e questo è indice della diversa maturazione della matrice extracellulare deposta dagli osteoblasti, finezza non apprezzabile nelle sezioni colorate con E/E. Nelle Figure 31a e 31b si possono individuare i nuclei degli osteoblasti incastonati nella matrice da loro stessi deposta, questo fa indurre il cambiamento fenotipico di queste cellule da quello osteoblastico a osteoclastico. Soffermando l'attenzione sulla superficie di contatto tra biomateriale/tessuto ospite si osservano molti nuclei di dimensioni rilevanti appartenenti agli osteoblasti che lavorano alla deposizione di nuova matrice extracellulare. È ragionevole pensare che l'ottima rigenerazione ossea è resa possibile dalla presenza di numerosi vasi presenti in prossimità del biomateriale che aiutano la migrazione di cellule osteoprogenitrici e l'approvvigionamento di nutrienti nonché

l'eliminazione dei prodotti di scarto.

L'adesione degli osteoblasti ovini alla superficie biomateriale/tessuto ospite è meglio apprezzabile ad ingrandimenti più grandi (Figure 32 e 33). Nella Figura 32 si riesce ad apprezzare meglio la diversità di colorazione tra le fibre di collagene deposte dai fibroblasti ovini (azzurro chiaro) con la zona di woven bone.

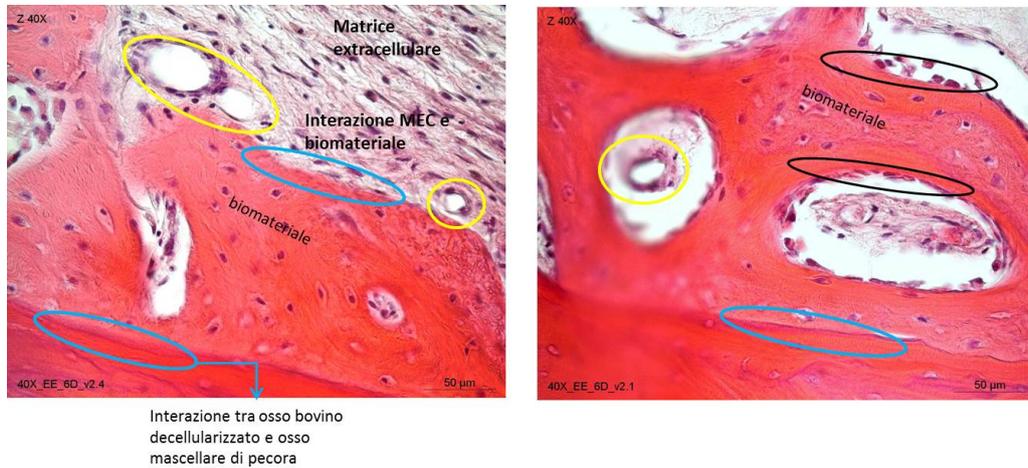


Figura 32: Innesto di osso bovino decellularizzato all'interno del seno di pecora a 30 giorni (40x) colorazione E/E

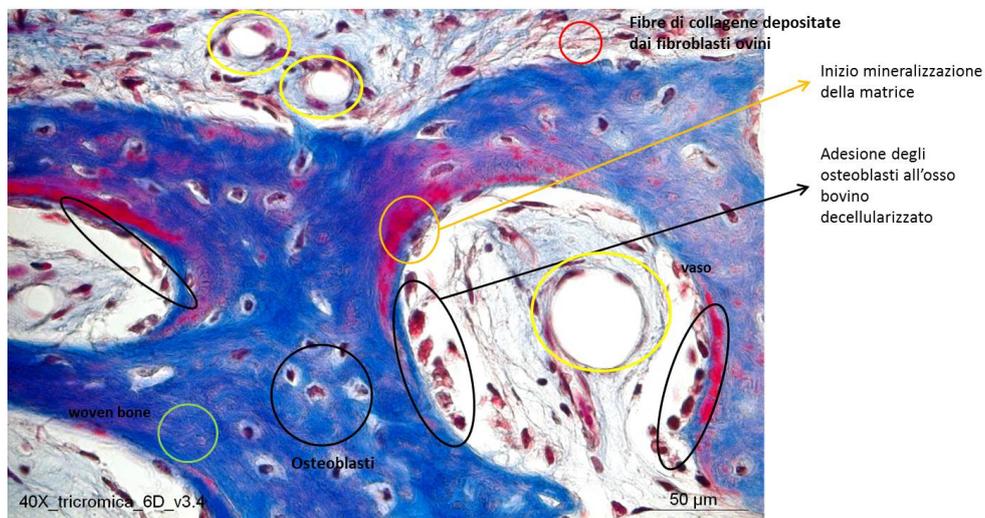


Figura 33: Innesto di osso bovino decellularizzato all'interno del seno di pecora a 30 giorni (40x) colorazione con Tricromica di Masson

Biomateriali sintetici: test in-vitro

Test MTT

Per determinare il tasso di proliferazione dei fibroblasti seminati e coltivati sui dischi, è stato effettuato il test della citotossicità basato sul saggio MTT (metil tiazolil-tetrazolium). Il test si basa sulla vitalità mitocondriale, ossia solo mitocondri funzionali possono ossidare una soluzione MTT, dando come prodotto finale la tipica colorazione blu-violetto. I risultati ottenuti si possono vedere nelle immagini seguenti (Figura 34, 35 e 36).

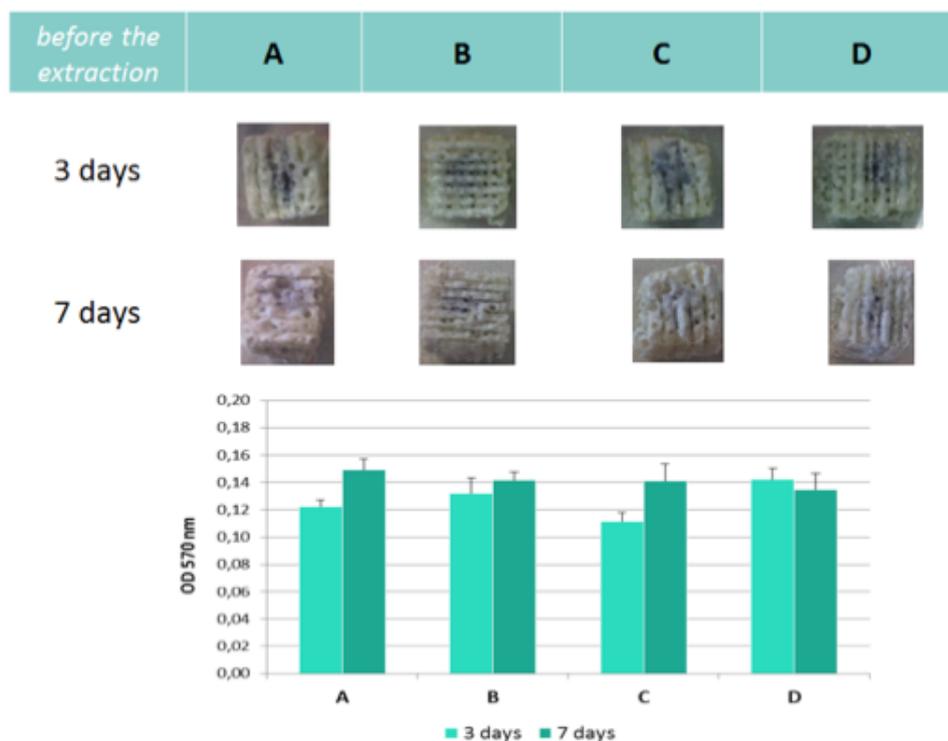


Figura 34: analisi MTT a 3 e 7 giorni di coltura su quattro differenti biomateriali sintetici

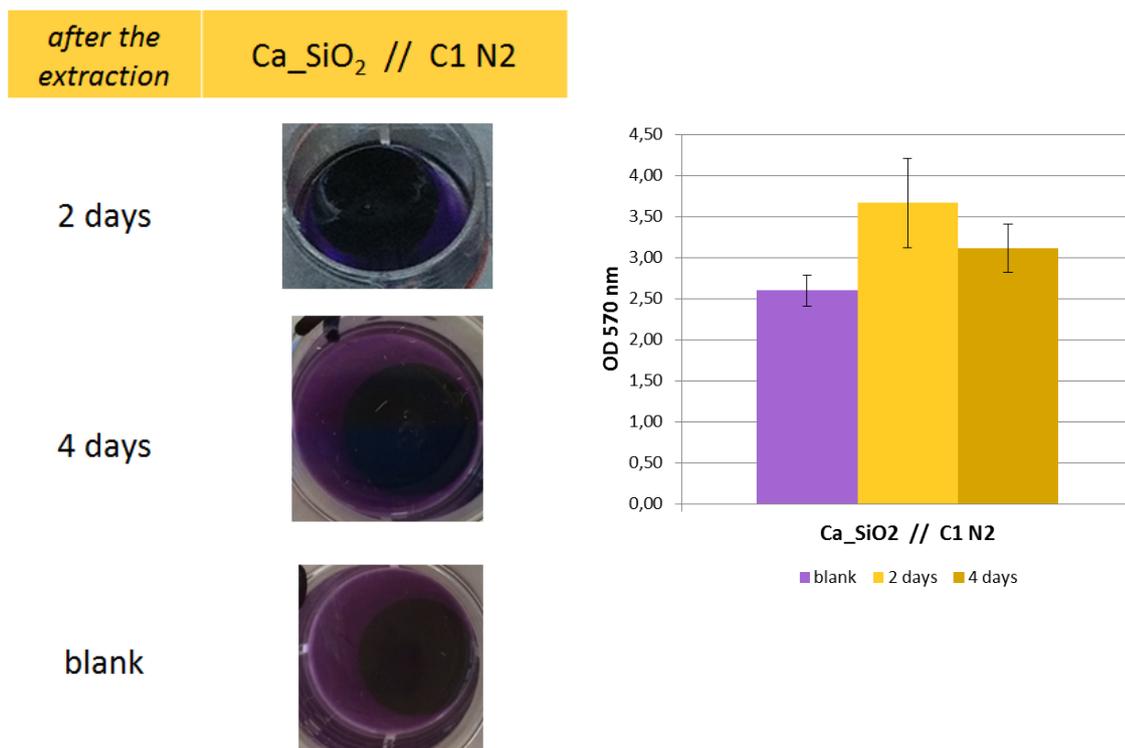


Figura 35: analisi MTT a 2 e 4 giorni di coltura su un biomateriale sintetico. Si noti come anche l'assenza di cellule (blank) dia una colorazione.

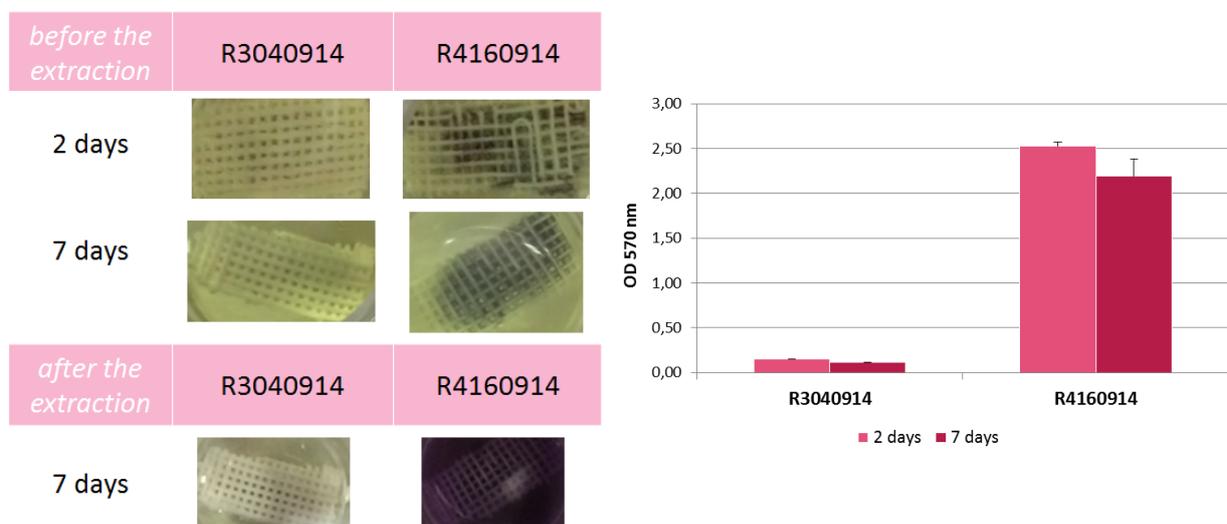


Figura 36: analisi MTT a 2 e 7 giorni di coltura su due differenti biomateriali sintetici

Appare notevole la variabilità a seconda del materiale testato e delle caratteristiche dello stesso. In alcuni casi anche il solo biomateriale senza la presenza di cellule seminate, è in grado di dare un rumore di fondo al saggio MTT (Figura 35). Questo porta a dover riconsiderare l'utilizzo di questa metodica di indagine con questi biomateriali.

Membrane

Membrane naturali: pericardio bovino

Sviluppo in vitro di protocollo per la deproteinizzazione e decellularizzazione di pericardio

A seguito dei risultati ottenuti i due protocolli che hanno mostrato risultati migliori sono stati i seguenti.

Protocollo 1:

- taglio di strisce di pericardio da 0,5x2 cm;
- lavaggio in SALINA [NaCl 0,9%] a RT (temperatura ambiente) per 1 ora;
- trattamento con IPOTONICA [PBS diluito 10 volte] + 10% DMSO (dimetilsolfossido) + 10 mM Acido Ascorbico + IP (Inibitori di Proteasi) a 4°C per 3 ore in agitazione;
- lavaggio con una soluzione di 1% TRITON + IP in IPOTONICA a 4°C 12 ore in agitazione;
- lavaggio con una soluzione di 0,1% TRITON in IPOTONICA a 4°C 12 ore in agitazione;
- trattamento con IPERTONICA [0,5 M NaCl in PBS] a RT 12 ore in agitazione;
- lavaggio con una soluzione 10 mM SD in IPOTONICA a RT 12 ore in agitazione;
- lavaggio con IPOTONICA a RT per 1 ora in agitazione.

Protocollo 2:

- Lavaggio con SALINA [NaCl 0,9%];
- Congelamento a secco a -80°C;
- Scongelamento a secco a RT;
- Congelamento a secco a -80°C;
- Scongelamento a secco a RT;
- Congelamento in IPOTONICA a -80°C;
- Scongelamento in IPOTONICA a RT;
- Congelamento in IPOTONICA a -80°C;
- Scongelamento in IPOTONICA a RT;
- IPOTONICA + 0,1% SD + IP + 0,1% EDTA a RT;
- PBS + 10 mM MgCl₂ + 50 ug/mL BSA + 50 U/mL DNase + 1U/mL Rnase A 37°C;

- PBS + IP a 4°C;
- 10% ISOPROPANOLO in SALINA;
- Lavaggio in PBS;
- Congelamento a -80 °C.

Test di Proliferazione: MTT

Il test di proliferazione MTT è stato eseguito su tutti i campioni di pericardio. Lo scopo è quello di valutare la presenza di cellule vive sul materiale trattato, trattandosi di un protocollo di decellularizzazione ci si aspetta che dopo il trattamento il materiale biologico presenti un'attività cellulare nulla. Il test è un saggio che consiste in un test colorimetrico (Figura 37).

Come si può notare nel grafico sottostante entrambi i protocolli di decellularizzazione illustrati precedentemente, si sono dimostrati efficaci nel ridurre la vitalità delle cellule presenti nel tessuto.

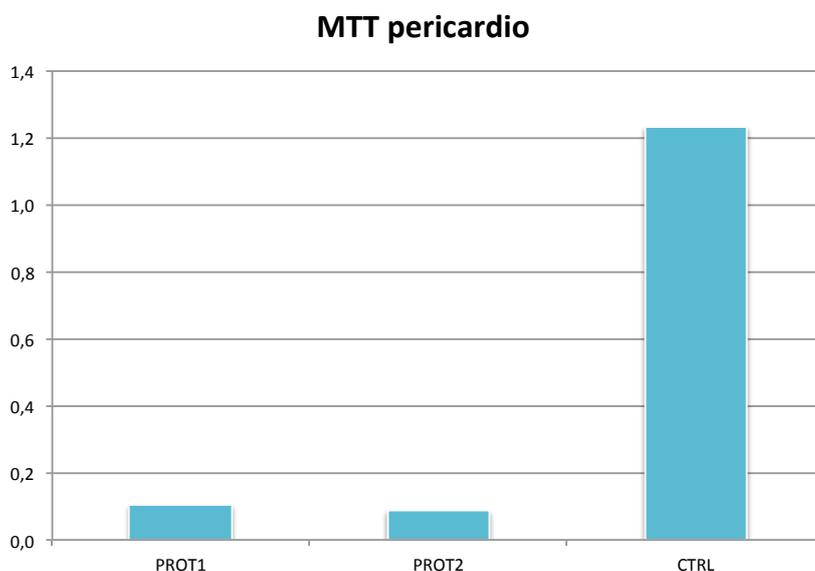


Figura 37: analisi MTT. Confronto tra i due protocolli più performanti e un campione non trattato

Inattivazione virale

I materiali trattati secondo i protocolli individuati sono stati messi in coltura a contatto con fibroblasti umani per una settimana. Al termine della quale si è preduto ad estrarre l'RNA ed a effettuare analisi di espressione genica di presenza virale. In nessun caso si è osservata presenza di espressione genica virale.

Confronto con membrane del commercio

Parallelamente alla semina di fibroblasti umani sulle membrane trattate secondo i differenti protocolli, si è proceduto anche con la semina degli stessi fibroblasti su altre membrane presenti in commercio al fine di valutare dove la proliferazione fosse più favorita. Dopo 1 giorno e 5 giorni dalla semina è stato effettuato il saggio MTT (come precedentemente descritto) su tutti i campioni. Le membrane in pericardio bovino trattate secondo i protocolli di decellularizzazione precedentemente descritti hanno dimostrato risultati migliori o paragonabili a quelli delle membrane presenti in commercio (Figura 38).

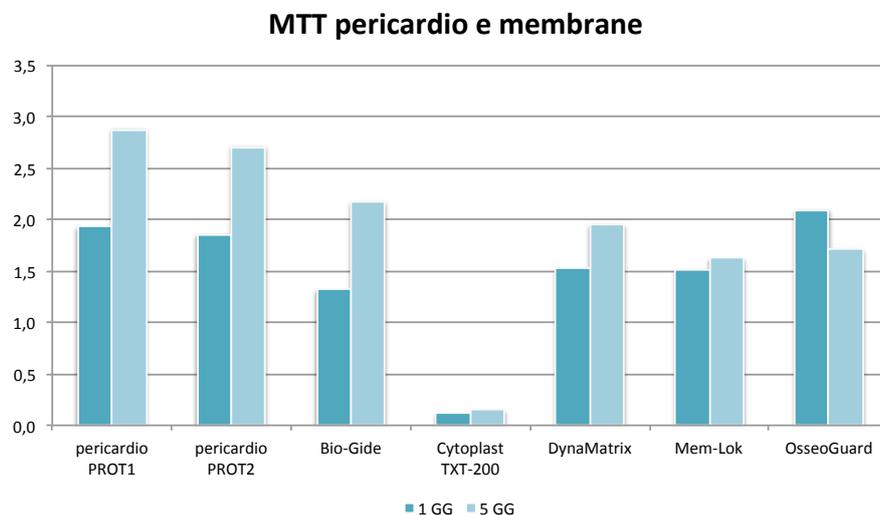


Figura 38: analisi. Confronto, a 1 e 5 giorni dalla semina delle cellule, della proliferazione su differenti membrane

Analisi istologiche in vitro e in vivo

Per valutare l'effetto barriera e il mantenimento dell'architettura della membrana, dopo aver coltivato i fibroblasti sulla sua superficie, si è proceduto ad effettuare l'analisi istologica. I risultati sono presentati nelle seguenti immagini (Figura 39). Si nota come i componenti originali del pericardio come le fibre collagene siano mantenute a garanzia della proprietà elastica del tessuto. Anche l'effetto barriera è evidente. I fibroblasti infatti si depositano sulla superficie del pericardio senza penetrare negli strati più profondi del tessuto.

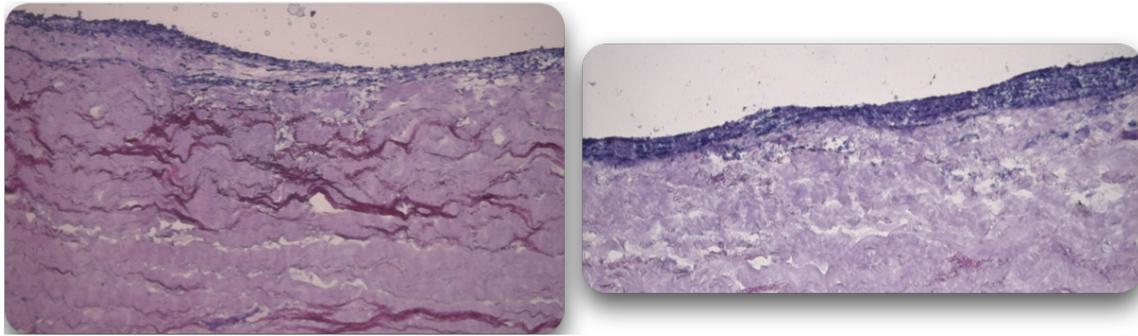


Figura 39: preparati istologici di pericardio decellularizzato e seminato con fibroblasti

Al fine di valutare la biocompatibilità delle membrane trattate, si è preceduto con l'impianto in vivo nel sottocute di ratti della membrana definita controllo ovvero quella non trattata e di due campioni ciascuno trattato secondo uno dei due protocolli rivelatisi migliori. A 7 giorni e a 14 giorni gli animali sono stati sacrificati ed è stata condotta l'analisi istologica per analizzare la presenza di eventuale reazione infiammatoria (Figura 40). Come si evince dalle immagini, non è presente infiltrato infiammatorio.

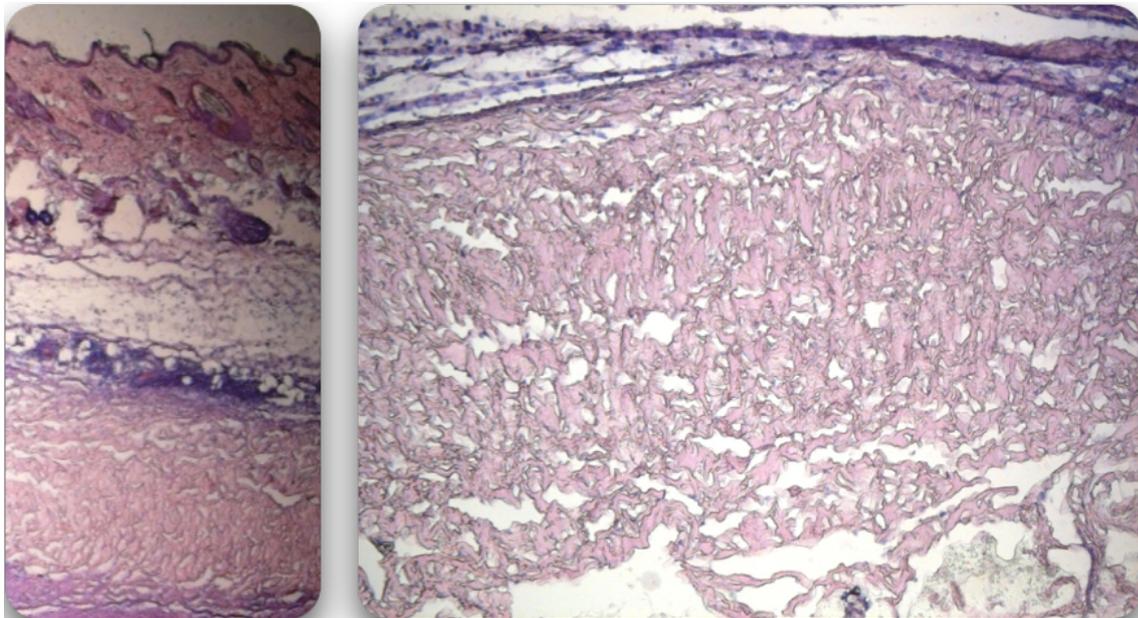


Figura 40: preparati istologici di pericardio decellularizzato innestato in vivo sottocute in modello murino

Membrane sintetiche: polietilene glicole

La proliferazione cellulare e la morfologia

Le ADSCs erano in grado di proliferare sulla superficie dello scaffold, aumentando il loro numero, come dimostrato dal test di proliferazione eseguito a 3, 7 e 15 giorni di coltura in terreno standard (Figura 41).

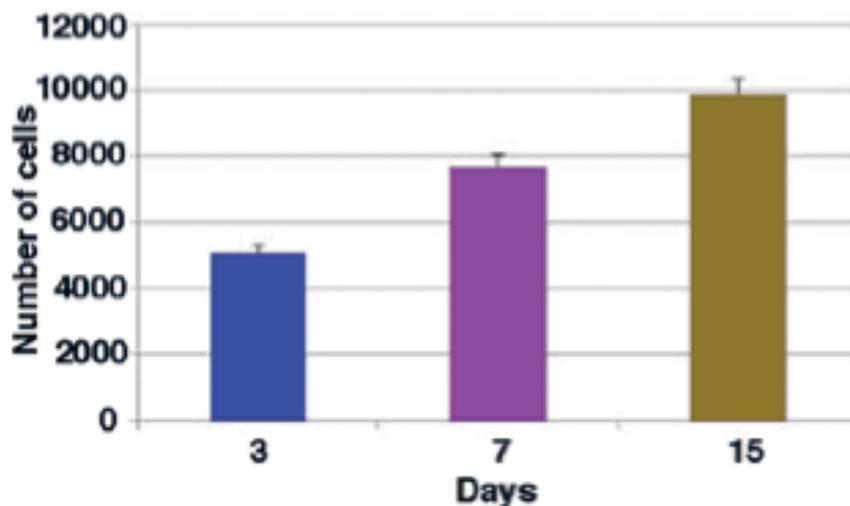


Figura 41: Test proliferazione delle ADSCs seminate su idrogel PEG . La proliferazione cellulare è stata valutata misurando il contenuto di DNA in colture cellulari dopo 3, 7 e 15 giorni dalla semina in terreno standard.

Le immagini SEM acquisite 3 ore dopo la semina hanno rivelato che le cellule hanno iniziato ad attecchire al substrato (Figura 42a). Dopo 15 giorni di coltura in vitro senza terreno di differenziamento, le ADSCs aderivano agli scaffold, formando un monostrato cellulare continuo caratterizzato da un tipico fenotipo osteoblastico (a stella) (Figura 42b).

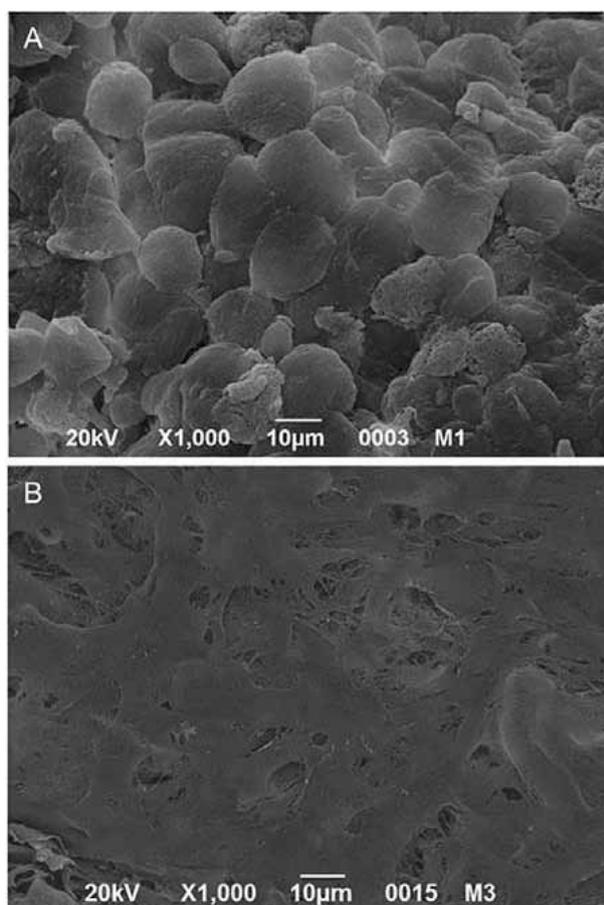


Figura 42: Analisi SEM di ADSCs su PEG idrogel dopo 3 ore (A) e 15 giorni (B) di cultura in terreno standard.

L'espressione genica

La real time PCR è stata eseguita su culture di ADSCs 3D in presenza di fattori osteoinduttivi, fattori vascolari o terreni standard. Le ADSCs coltivate su idrogel PEG senza supporto di differenziazione hanno mostrato un profilo di espressione osteoblastica ben definito (Figura 43, barre verdi). Infatti, è stata osservata l'espressione di osteonectina, di osteocalcina, e di collagene di tipo I, con valori comparabili a quelli ottenuti con il terreno osteogenico (Figura 43, barre blu). Questi risultati confermano che la presenza del solo idrogel era sufficiente per indurre la differenziazione ossea delle cellule staminali. Le ADSCs coltivate su idrogel PEG con terreno vascolare (Figura 43, barre arancioni) hanno espresso marcatori con fenotipo di cellule vascolari (CD31 e Fattore di von Willebrand). Al contrario, nessuna espressione di marcatori vascolari è stata rilevata nelle ADSCs coltivate in terreno standard.

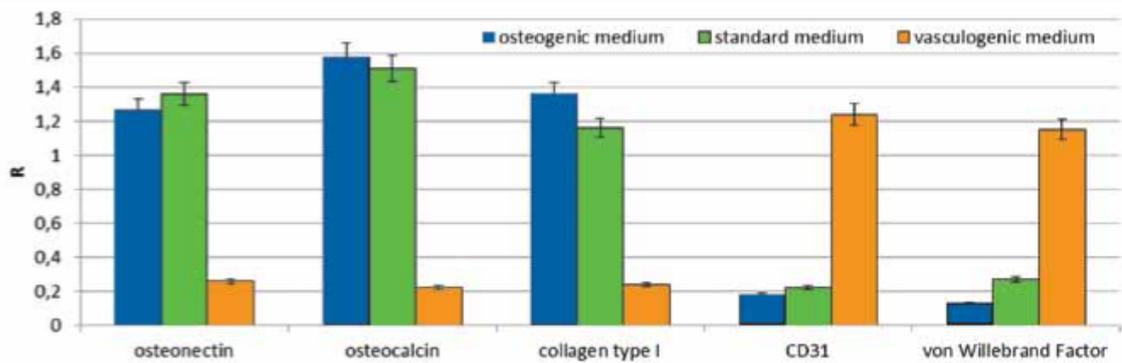


Figura 43: Real time PCR di ADSCs coltivate su PEG idrogel per 15 giorni in terreno osteogenico (barre blu), in terreno standard (barre verdi) o terreno vascolare (barre arancioni). Profilo di espressione di marcatori osteogenici (osteonectina, osteocalcina e collagene di tipo I) e marcatori vascolari (CD31 e fattore di von Willebrand).

Array CGH

Per identificare alterazioni genomiche, il DNA è stato estratto da cellule derivate da due differenti donatori e seminato nell'idrogel PEG per un massimo di 15 giorni. Come mostrato in Figura 44, non sono rilevabili squilibri cromosomici (duplicazioni o delezioni di regioni di DNA) in entrambe le popolazioni cellulari dei donatori, confermando che né colture a lungo termine, né l'impiego di fattori di crescita inducono alterazioni strutturali del DNA.

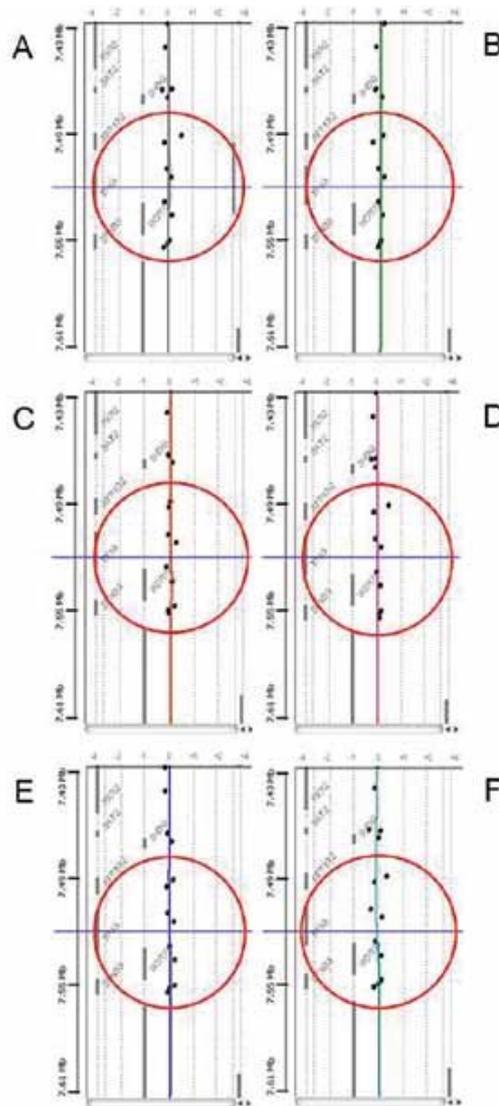


Figura 44: analisi CGH di ADSCs coltivate su PEG idrogel per 15 giorni. Le cellule isolate da due differenti donatori e coltivate in terreno osteogenico (A, B), terreno standard (C, D) o terreno vascolare (E, F). La figura mostra una regione rappresentativa dell'intero genoma analizzato, in particolare la regione del gene p53 (indicato dai cerchi rossi).

Superfici implantari

Sono stati utilizzati due tipi di dischi di Titanio di diametro 5 mm e spessore 2 mm che riproducessero le caratteristiche della superficie implantare. Gli impianti con tale superficie sono già presenti in commercio (Implacil De Bortoli-Dental, São Paulo, Brasile).

- dischi *controllo* di Titanio: dischi di Titanio sabbiato con microparticelle di anidride Ti (TiO_2), con una dimensione media delle particelle di 180 micron, e mordenzati con acido maleico;

- dischi di Titanio *trattati*: dischi di Titanio sabbiati e mordenzati come sopra, poi trattati con ioni inorganici.

Test di Ames

Il test di Ames è un test genetico per l'analisi della genotossicità di una sostanza. Il principio del test si basa sulla valutazione della capacità di un sospetto mutageno di provocare la reversione di un carattere auxotrofo his- in un ceppo di batteri mutato (*Salmonella typhimurium*), rendendolo nuovamente capace di sopravvivere in un terreno privo di istidina.

Le superfici implantari analizzate si sono rivelate sicure dal punto di vista mutagenico.

Test di emolisi

Il test di emolisi è stato eseguito al fine di valutare la compatibilità del sangue sui dischi di Ti controllo e trattati (materiali di prova).

I risultati sono riportati nella seguente Tabella 11 in cui si può notare l'assenza di emolisi prodotta dal contatto del sangue con i dischi di titanio.

Samples	OD	Hemolysis rate
Positive control	0.8762 ± 0.012	-
Negative control	0.0143 ± 0.002	0%
Samples control	0.0147 ± 0.002	0,046%
Samples disks treated	0.0153 ± 0.002	0,046%

Tabella 11: risultati test di emolisi. Assenza di emolisi prodotta dal contatto del sangue con i dischi di titanio.

Test MTT

Cellule staminali della polpa dentale (DPSCs) sono state seminate su dischi controllo e dischi trattati di titanio ad una densità di 5×10^3 cellule/dischi in una piastra a 96 pozzetti. Per determinare il tasso di proliferazione delle cellule coltivate sui dischi di titanio controllo e trattati, è stato eseguito il test della citotossicità basato sul test del MTT (metil tiazolil-tetrazolium) Tutti i campioni sono stati esaminati dopo 15 e 25 giorni di coltura.

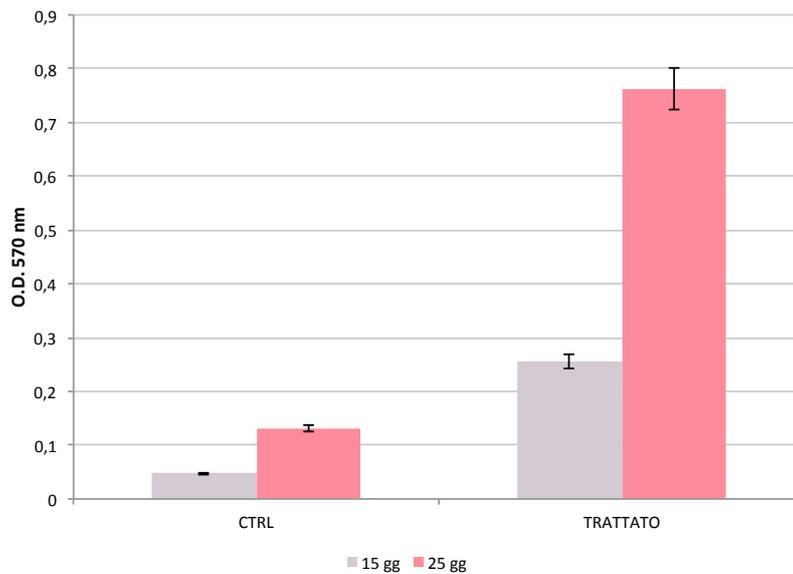


Figura 45: test MTT. DPSCs sono state seminate su dischi controllo e dischi trattati. Tutti i campioni sono stati esaminati dopo 15 e 25 giorni di coltura

Sia a 15 che soprattutto a 25 giorni la proliferazione delle cellule staminali della polpa dentale seminate sui dischi di titanio trattati ha dimostrato risultati migliori rispetto a quelle seminate sui dischi controllo.

Letture al microscopio elettronico (SEM)

Per la lettura al microscopio elettronico (SEM) sono state osservate le DPSCs coltivate per 15 e 25 giorni sui dischi di titanio trattati e controllo. Sono stati esaminati anche i dischi di titanio di controllo e trattati senza cellule.

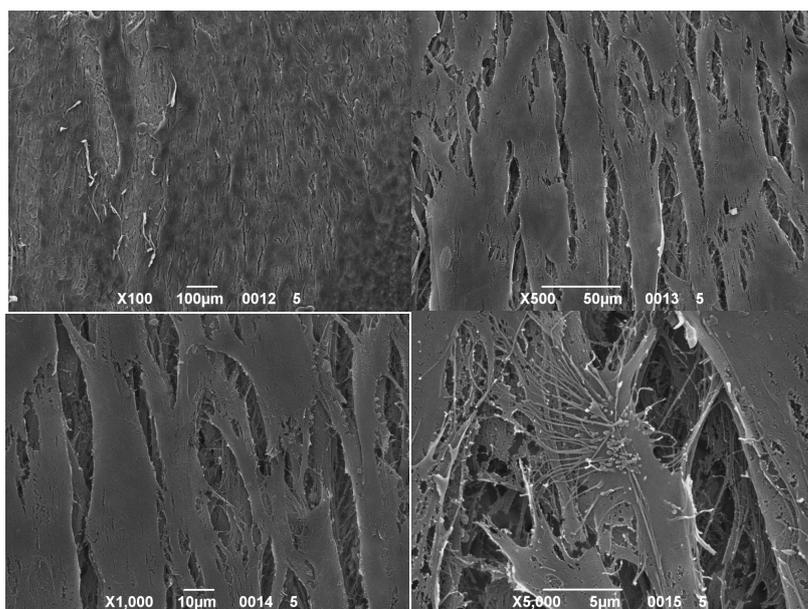


Figura 46: immagini SEM. sono state osservate le DPSCs coltivate 25 giorni sui dischi di titanio trattati

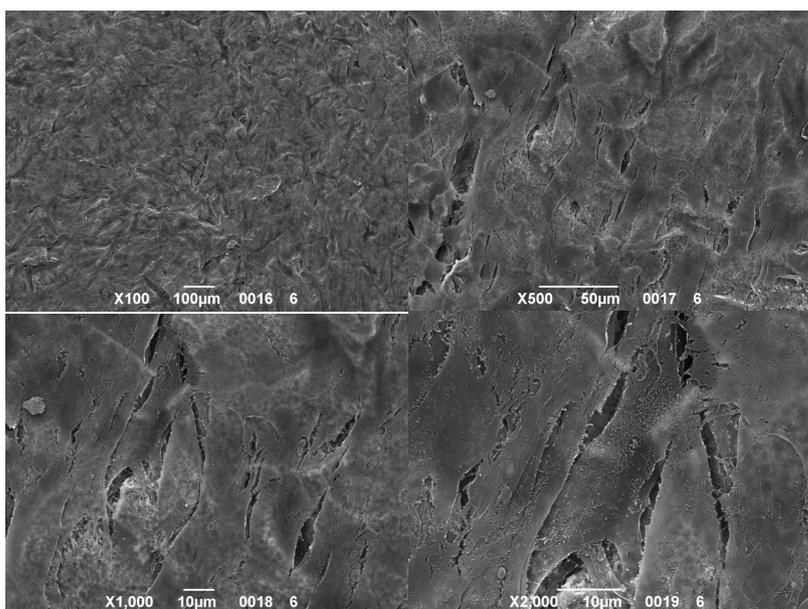


Figura 47: immagini SEM. sono state osservate le DPSCs coltivate 25 giorni sui dischi di titanio controllo

L'analisi al microscopio elettronico a scansione dei dischi di titanio trattati e controllo su cui siano state seminate DPSCs ha evidenziato come nelle superfici trattate la disposizione delle cellule sia più fitta. Le cellule si distribuiscono in più strati, in intimo contatto tra di loro e con la superficie implantare. La morfologia cellulare è di tipo osteocitario. Ciò indica che la superficie di titanio è in grado di permettere una differenziazione cellulare in senso osteoblastico.

Nel confronto tra 15 e 25 giorni si nota come al passare del tempo le cellule siano più densamente disposte e come aumentino le interazioni tra di loro.

Real-time PCR

Le differenze di espressione genica sono state valutate con il metodo $2\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001), utilizzando le DPSCs coltivate su dischi di titanio di controllo per 15 giorni come condizione di controllo. I valori sono stati normalizzati per l'espressione del gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) riferimento interno, la cui quantità non è cambiata nelle nostre condizioni sperimentali.

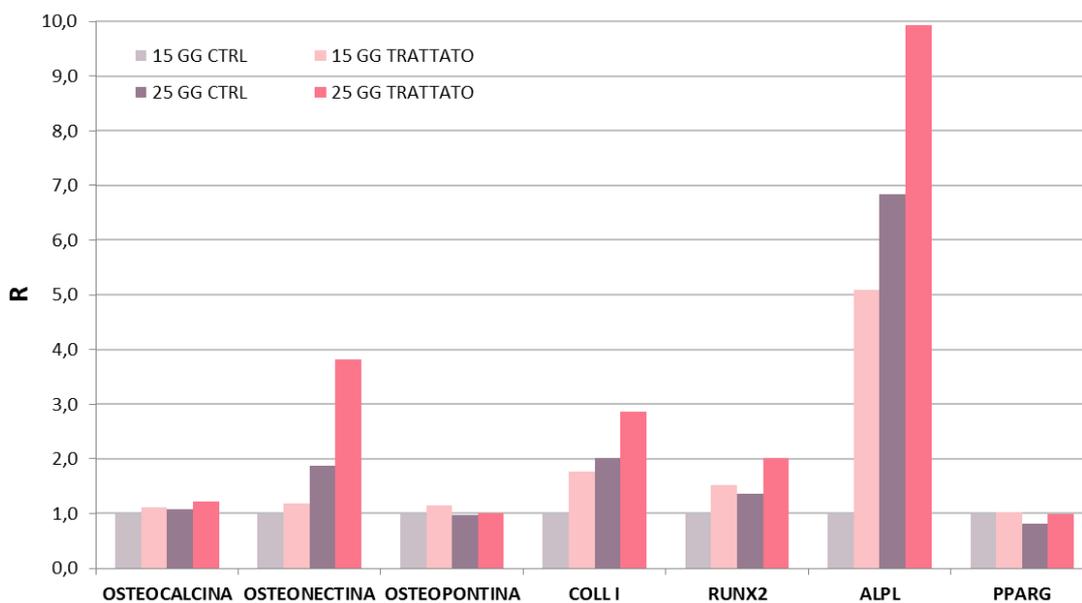


Figura 48: analisi real time PCR. Le DPSCs coltivate su dischi di titanio di controllo per 15 giorni erano la condizione di controllo

L'analisi con PCR ha evidenziato l'espressione di componenti della matrice ossea, osteopontina, osteonectina, e osteocalcina che sono fondamentali per l'interazione tra la matrice extracellulare e le cellule, ed essenziali per la mineralizzazione della matrice. La composizione appropriata della matrice extracellulare è stata anche confermata dalla espressione di collagene di tipo I, che è essenziale per la formazione e la maturazione dei cristalli di idrossiapatite. La differenziazione osteogenica è stata anche accertata valutando l'espressione dei fattori di trascrizione RUNX2 e PPARg. La differenziazione delle MSC è governata dalla espressione e/o attivazione di questi fattori di trascrizione: RUNX2 determina la loro differenziazione in osteoblasti, mentre PPARg chiede loro differenziazione in

adipociti. PPARg ha un ruolo importante nel metabolismo osseo (Viccica et al., 2010). Si facilita l'adipogenesi a scapito dell'osteogenesi, soprattutto inibendo la funzione di RUNX2 e riducendo il numero di osteoblasti nel midollo osseo. Viceversa, un aumento dell'espressione RUNX2 inibisce l'adipogenesi e favorisce l'osteogenesi (Kawai et al., 2009). In presenza di fattori osteogenici, le colture tridimensionali rivelano un graduale aumento dell'espressione RUNX2 coincidente con una marcata riduzione nell'espressione di PPARg, confermando che la differenziazione osteogenica avviene a scapito della differenziazione adipogenica.

Analisi del cariotipo

Dopo 25 giorni di coltura su dischi di Ti trattati, le metafasi di cellule sono state Q-bandate e cariotipate secondo le linee guida del Sistema Internazionale per la nomenclatura citogenetica umana. Sono state analizzate venticinque metafase per tre espansioni.

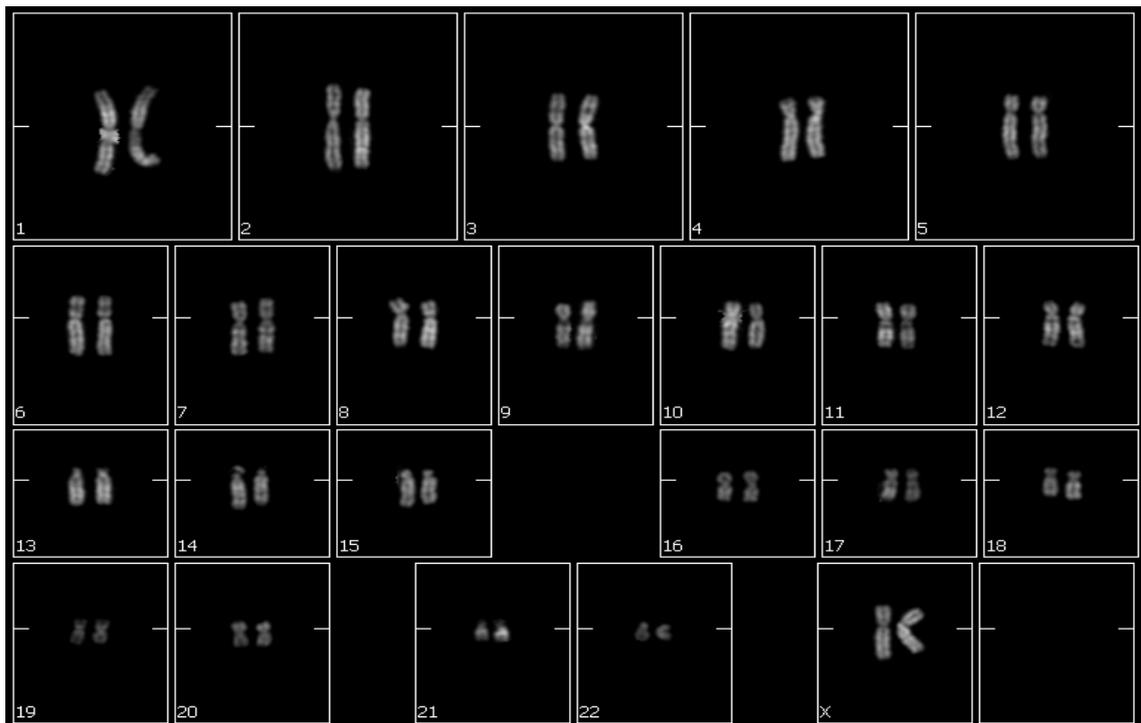


Figura 49: analisi del cariotipo dopo 25 giorni di coltura su dischi trattati

Dall'analisi del cariotipo è stata evidenziata la sicurezza delle superfici trattate. La sicurezza in questo senso è stata accertata verificando la loro stabilità cromosomica mediante un'analisi del cariotipo. Questo è uno dei test diagnostici

più comunemente utilizzati per identificare anomalie cromosomiche nei settori della oncologia, ginecologia e pediatria.

Array CGH

Per identificare alterazioni genomiche, il DNA è stato estratto da cellule derivate da due differenti donatori e seminato nei dischetti di titanio per un massimo di 15 giorni. Come mostrato in Figura 50, non sono rilevabili squilibri cromosomici (duplicazioni o delezioni di regioni di DNA) in entrambe le popolazioni cellulari dei donatori, confermando che né colture a lungo termine, né l'impiego di fattori di crescita inducono alterazioni strutturali del DNA.

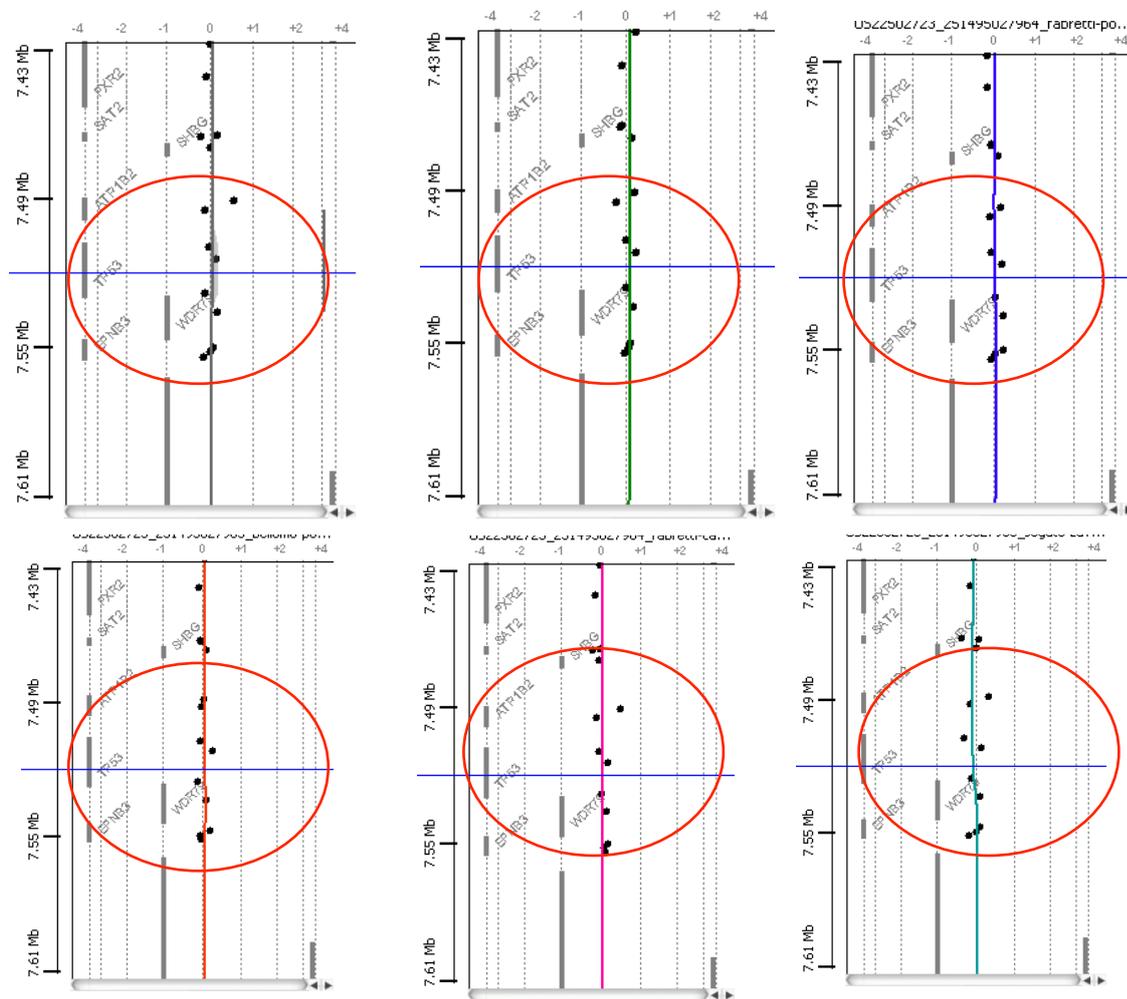


Figura 50: Array CGH. Non sono rilevabili squilibri cromosomici (duplicazioni o delezioni di regioni di DNA)

La stabilità genetica dei preparati è stata analizzata utilizzando l'ibridazione genomica comparativa (CGH). Questa tecnica citogenetica molecolare basata sull'

estrazione del DNA dalle cellule e la successiva identificazione di eventuali variazioni nel numero di coppie di geni distribuiti in tutto il genoma. Questo metodo consente di quantificare le cancellazioni e le amplificazioni del gene con una accuratezza superiore al cariotipo, individuando con precisione i domini e i punti delle regioni coinvolte in qualsiasi squilibrio dall'inizio alla fine. Il metodo CGH dimostra la stabilità genetica dei prodotti tridimensionali. L'analisi del CGH ha permesso di stabilire la sicurezza genica del prodotto in un potenziale innesto nell'uomo.

Il trattamento proposto consente una maggiore proliferazione cellulare, un maggior differenziamento cellulare con cellule che aderiscono con buona morfologia osteocitaria e che sono geneticamente stabili.

Discussione

Le lesioni causate da traumi, condizioni di edentulia, resezioni di tumore o cisti, infezioni, l'atrofia estrema dopo estrazioni dentarie possono dare gravi problemi funzionali, estetici e psicologici (Cohen, 1995; Hunt and Hobar, 2003).

Le estrazioni dentarie sono sempre seguite da un certo grado di fisiologico riassorbimento dell'osso alveolare. L'estrazione di un dente comporta la perdita del legamento parodontale e, con essa, la perdita dell'apporto ematico al tessuto osseo. Studi in vitro, su modelli animali (Lindhe et al., 1984; Lindhe et al., 1992), e studi clinici (Caneva et al., 2012; Caneva et al., 2013) hanno evidenziato la diminuzione dei tessuti duri e molli dopo un'estrazione dentale. La condizione risultante di atrofia ossea può anche essere aggravata dalla presenza di protesi mobili che appoggiano direttamente sulla mucosa alveolare, dando luogo a un grave riassorbimento osseo.

In tali situazioni, l'assenza di tessuti duri e molli può spesso compromettere funzioni di base quali: la masticazione, la fonazione e anche le condizioni psicologiche (Curtis et al., 1997; Davis and Telischi, 1995; Kadota et al., 2008; Urken et al., 1991). La progressione di alcune condizioni orali può anche provocare dei difetti cranio-facciali di difficile risoluzione.

La parodontite è una malattia cronica infiammatoria di eziologia batterica, caratterizzata dalla perdita di sostegno attorno ai denti, con riassorbimento dell'osso alveolare e alterazioni dei tessuti molli (Feng and Weinberg, 2006; Genco, 1992; Kinane and Bartold, 2007).

Oggi, la terapia implantare è considerata come un approccio estremamente affidabile per sostituire i denti mancanti. L'introduzione degli impianti osteointegrati in odontoiatria ha rappresentato un punto di svolta nella pratica clinica odontoiatrica. Le aspettative di un paziente per la riabilitazione protesica sono sempre più alte, soprattutto per quanto riguarda la qualità della vita e la funzionalità. L'introduzione di impianti dentali ha portato ad un punto di svolta nella riabilitazione di pazienti parzialmente o totalmente edentuli.

La sostituzione dei denti con impianti dentali, che è una delle terapie più diffuse per edentulie totali o parziali, può essere soggetta a una patologia simile alla parodontite nota come peri-implantite (Misch, 2008).

Come principio generale per la chirurgia implantare, le superfici degli impianti

dovrebbero essere circondate da osso alveolare. A volte, a causa di limitazioni anatomiche o protesiche della cresta alveolare, non è possibile inserire opportunamente gli impianti nell'osso. Diventa necessario quindi ricorrere a procedure di rigenerazione ossea guidata (GBR). Esistono diversi metodi per la ricostruzione dell'osso alveolare distrutto. Nella maggior parte dei casi di GBR, si utilizza osso autologo o sostitui ossei e membrane a protezione del materiale innestato. (Cowin, 2001). Il raggiungimento di una rigenerazione prevedibile nel trattamento dei difetti craniofacciali è difficile data la grande variabilità di situazioni cliniche dovute alla perdita di sostegno strutturale, alle diverse origini embriologiche dei tessuti colpiti e ad altri fattori.

I materiali autologhi sono stati ampiamente utilizzati e sono ancora considerati il gold standard a cui tutti gli altri biomateriali sono paragonati (Dimitriou et al., 2011a). Gli innesti autologhi contengono tutti gli elementi essenziali necessari per indurre la rigenerazione tissutale, le cellule, la matrice extracellulare e le citochine (Khan et al., 2005; Pape et al., 2010).

A questo scopo sono state analizzate le caratteristiche del particolato osseo mandibolare prelevato ex vivo in sede di terzo molare mandibolare. Le analisi sulla vitalità cellulare dimostrano come al passare del tempo di conservazione del campione prelevato fuori dal cavo orale, la vitalità delle cellule al suo interno vada diminuendo. Contestualmente, col trascorrere del tempo, vi è un progressivo aumento della produzione e rilascio di fattori pro-infiammatori come il TNF. Una volta che il materiale prelevato dovesse poi essere utilizzato per le procedure di aumento osseo, questo porterebbe con sé nel sito ricevente anche tutti quei fattori pro-infiammatori precedentemente prodotti. Al fine di analizzare la risposta in vivo dei tessuti alla presenza di un biomateriale ricco di mediatori dell'infiammazione, si è utilizzato il modello del rialzo del seno mascellare sulla pecora. Le analisi istologiche a diversi intervalli di guarigione dopo l'operazione, mostrano come effettivamente questi mediatori siano in grado di stimolare una risposta infiammatoria marcata nel sito ricevente l'innesto. Quando all'innesto vengono aggiunte cellule staminali, queste hanno dimostrato di poter modulare e ridurre l'infiltrato infiammatorio riscontrabile nelle istologie. Pieri et al. (Pieri et al., 2010) hanno dimostrato che il trapianto di ASC autologhe con uno scaffold di osso bovino inorganico (Bio-Oss) arricchisce la formazione di nuovo osso e l'osteointegrazione dell'impianto seguendo un aumento osseo verticale dell'osso di

calvaria di coniglio, il che suggerisce che le ASC possono essere utili per l'aumento alveolare verticale per il trattamento implantare. (Wen et al., 2011). Oltre alla riparazione dei tessuti e la rigenerazione, sono recentemente state identificate le proprietà immunomodulatorie per MSC negli animali e negli esseri umani che possono essere correlati ad effetti terapeutici, come l'angiogenesi, azione anti-infiammatoria e antiapoptosica (Nauta and Fibbe, 2007). Inoltre, recenti studi suggeriscono che le MSC hanno una bassa immunogenicità intrinseca (Rasmusson et al., 2007). Pertanto, le proprietà immunomodulatorie delle MSC possono renderle più attraenti rispetto ad altri tipi di cellule staminali per alcune applicazioni di innesto cellulare. In una recente revisione di Ren et al. (Ren et al., 2012) è stato sottolineato che i meccanismi terapeutici delle MSC includono la loro efficacia di guarigione nei siti donatori in tessuti feriti il loro potenziale di differenziazione, la loro capacità di produrre una grande quantità di fattori trofici e il loro effetto immunomodulante.

Le tecniche ricostruttive più avanzate utilizzando materiali autologhi sono spesso insufficienti per ripristinare estesi o complessi difetti maxillofacciali (Susarla et al., 2011). L'uso di tessuto autologo inoltre, comporta la necessità di prelievo da un sito donatore, con i conseguenti svantaggi in termini di costi, tempi di procedura, discomfort del paziente e possibili complicanze. Spesso il volume del tessuto prelevato non è sufficiente per riempire o coprire il difetto, data la limitata disponibilità di tessuti autologhi (Dimitriou et al., 2011b; Zouhary, 2010). Per superare queste limitazioni, una varietà di materiali sostitutivi omologhi o eterologhi sono stati introdotti nella pratica clinica negli ultimi trent'anni. (Bauer and Muschler, 2000; De Long et al., 2007). Questi materiali agiscono principalmente come scaffold, supportando la migrazione delle cellule dalla periferia all'area innestata. Questi materiali sono indicati nel trattamento dei casi in cui l'applicazione di innesti autologhi da sola non è possibile (Finkemeier, 2002).

Nelle nostre ricerche abbiamo sviluppato anche un biomateriale naturale di origine bovina, trattato secondo protocolli di decellularizzazione e poi utilizzato in modelli animali in vivo per mimare alcune delle situazioni cliniche che più frequentemente ci si trova a dover affrontare in odontoiatria. Oltre al rialzo di seno mascellare su pecora con differenti materiali di origine naturale in associazione o meno con cellule staminali, è stato studiato anche su cane l'innesto di biomateriale

in un difetto osseo peri-implantare per mimare i casi di difetto osseo prodotto da peri-implantite o deiscenze ossee. In tutte le situazioni analizzate i sostituti ossei studiati si sono dimostrati validi allo scopo. I casi in cui al biomateriale venissero associate delle cellule staminali, presentavano una rigenerazione ossea più rapida, una maggiore neoangiogenesi, una presenza di collagene aumentata. Gli studi effettuati su modelli animali hanno dimostrato il potenziale delle cellule staminali mesenchimali nel campo della rigenerazione ossea e dell'infiammazione. Sia in esperimenti su pecore e cani, la presenza di nuovi vasi sanguigni e di matrice extracellulare ci permette di affermare come le cellule staminali, con uno scaffold appropriato, sono in grado di promuovere la rigenerazione ossea più velocemente. Da un punto di vista di infiammazione, le cellule staminali mesenchimali (MSC) si sa migrino verso i siti con un danno tissutale e che partecipino ad una modulazione immunitaria, rimodellamento del tessuto e la guarigione delle ferite.

Purtroppo, quando si confrontano questi biomateriali a quelli autologhi emergono altri limiti. La presenza di popolazioni cellulari, l'organizzazione del rilascio dei fattori di crescita, il mantenimento di una struttura stabile e la stimolazione dell'angiogenesi, sono le chiavi fondamentali per il successo nella rigenerazione tissutale in quanto svolgono un ruolo fondamentale nel processo di guarigione (Taba et al., 2005). Il controllo delle dinamiche di questi elementi consente un trattamento dei difetti craniofacciali più predicibile.

Sono state recentemente sviluppate nuove terapie di ingegneria tissutale volte a consentire ai clinici di raggiungere una rigenerazione prevedibile. L'idea di utilizzare le cellule staminali a fini terapeutici è diventata realtà anche se è evidente dalle prove scientifiche accumulate ad oggi che sono necessarie ulteriori ricerche dati i numerosi problemi ancora da risolvere. In particolare, anche se le cellule staminali embrionali hanno un potenziale illimitato per la differenziazione, il loro uso è limitato per vari motivi. Ci sono non solo questioni etiche da considerare che ostacolano il loro trapianto, ma anche fenomeni di rigetto e il rischio di generare teratomi (Yu and Thomson, 2008).

Negli ultimi anni, con l'adozione di sostituti ossei bio-ingegneristici con cellule staminali mesenchimali (MSC), si è sviluppato in un approccio alternativo promettente per il trattamento di grandi difetti ossei senza gli effetti collaterali associati alle terapie convenzionali. L'uso di sostituti ossei cellulari è tuttavia limitato, a causa della loro limitata osteointegrazione, ciò è dovuto alla scarsa

vascolarizzazione dell'innesto. Le cellule nei tessuti naturali sono distribuite in modo che non siano mai più di 200 nm di distanza da un capillare, e questa distanza è sufficiente per garantire la diffusione di ossigeno, delle sostanze nutritive e delle scorie. Una volta che le cellule vengono innestate nei tessuti prodotti in laboratorio non devono essere troppo lontane dal capillare più vicino al fine di garantirne la sopravvivenza (Lovett et al., 2009). In generale, quando i sostituti ossei vengono trapiantati nell'osso nativo diventano vascolarizzati come conseguenza della risposta infiammatoria necessaria per la guarigione della ferita. Lo stato di ipossia delle cellule innestate può anche facilitare la vascolarizzazione dell'innesto attraverso il rilascio di fattori di crescita angiogenici. Questa vascolarizzazione spontanea è molto limitata e il processo è troppo lento per raggiungere le cellule più interne dell'innesto. La vascolarizzazione dei tessuti di sostituzione ossea rimane quindi uno dei principali ostacoli da superare prima che si abbiano dei risultati clinici soddisfacenti.

Qualora si riuscisse ad ottenere un sostituto osseo con tutte le caratteristiche precedentemente elencate, da un punto di vista clinico i vantaggi sarebbero molteplici: minor numero di atti chirurgici, l'eliminazione del materiale ottenuto dal sito donatore, e una rigenerazione più veloce.

Quando si effettuano procedure di rigenerazione ossea, è quasi sempre indispensabile l'utilizzo di una membrana che mantenga il volume, protegga l'innesto e che funga da barriera alle cellule epiteliali. In questo contesto, un nuovo idrogel di gelificazione in situ composto da due componenti PEG è stato recentemente proposto come un nuovo materiale per procedure GBR. In particolare, i componenti PEG hanno dimostrato di essere altamente biocompatibili, occlusivi delle cellule, e biodegradabili, in modo da soddisfare gli importanti criteri necessari per servire come una membrana di barriera (Rodan, 1992). Il test di proliferazione basato sulla quantificazione del DNA ha confermato che le ADSCs seminate su idrogel PEG sono aumentate di numero e hanno generato un tessuto vitale. L'analisi morfologica SEM ha mostrato che le cellule erano in grado di aderire alle nicchie del biomateriale, formando un monostrato sottile. Nel contesto dell'ingegneria dei tessuti e della medicina rigenerativa, è sempre più riconosciuto che è importante per i diversi tipi di cellule di coesistere in un ambiente 3D per generare strutture con una maggiore funzionalità e capacità di attecchimento (F Martini, 2012). Il tessuto adiposo è stato utilizzato come fonte di

cellule facilmente disponibile per la generazione di una struttura 3D con proprietà sia osteogeniche che vascolari. L'analisi dell'espressione genica per i marcatori osteogenici ha fortemente sostenuto l'impiego di cellule verso il fenotipo osteogenico. La PCR ha confermato la presenza di componenti della matrice extracellulare, come osteonectina e osteocalcina, che svolgono un ruolo fondamentale nell'interazione delle cellule con la matrice ossea e nella mineralizzazione della matrice, dopo 15 giorni di coltura 3D. L'espressione di collagene di tipo I, che è essenziale per la formazione e la maturazione dei cristalli di idrossiapatite, era chiaramente rilevabile, confermando la corretta composizione della matrice extracellulare. Nelle culture parallele contenenti fattori vascolari, le ADSCs sono state impegnate con le cellule endoteliali mature, come conferma l'espressione di marcatori di superficie, come CD31, e specifici fattori solubili endoteliali, come il fattore von Willebrand. Sorprendentemente, l'espressione di marcatori osteogenici era anche rilevabile quando le ADSCs sono state coltivate in idrogel senza fattori di differenziazione. Dettagliate analisi citogenetiche sono state eseguite per convalidare la sicurezza dell'idrogel PEG caricato con ADSCs. La sicurezza dei prodotti a base cellulare deve essere garantita prima dell'uso in impianti in vivo, per esempio attraverso la convalida della stabilità cromosomica. I risultati della matrice CGH non mostravano alterazioni del DNA, confermando in tal modo che le cellule erano in grado di differenziarsi pur mantenendo la stabilità genomica. In conclusione, l'idrogel PEG si comporta come un buon scaffold per indurre l'impegno osteogenico delle cellule staminali adulte, comunemente utilizzate per prodotti di ingegneria tissutale ossea, e allo stesso tempo sembra essere geneticamente sicura.

Parallelamente all'idrogel si sono sviluppati dei protocolli di decellularizzazione di membrane di origine naturale derivate da pericardio bovino. Il pericardio bovino è naturalmente un tessuto che funge da barriera, è ricco di fibre elastiche ed è facilmente reperibile. Per questo dopo aver stabilito il trattamento migliore al fine di avere a disposizione un tessuto inerte, si è proceduto alla semina di fibroblasti umani su campioni di pericardio e al confronto con altre membrane presenti in commercio. I campioni trattati secondo i nuovi protocolli si sono dimostrati più performanti di quelli già presenti in commercio. Ad ulteriore conferma delle proprietà di barriera del pericardio, questo è stato impiantato sottocute in modello animale di topo. Le istologie hanno evidenziato come le fibre elastiche fossero

mantenute, come l'effetto barriera della membrana fosse efficace e come i tessuti circostanti l'innesto non mostrassero segni di infiammazione.

Da alcuni anni, qualsiasi innesto di materiale prodotto in laboratorio nell'uomo è stato oggetto di attente valutazioni atte a garantire la sicurezza in termini di assenza di alterazioni genetiche. Per questo quando si è studiato un nuovo biomateriale naturale, una nuova membrana e una nuova superficie implantare, si è proceduto prima di tutto a verificare la sicurezza genetica dei prodotti. La loro sicurezza in questo senso potrebbe essere accertata verificando la loro stabilità cromosomica mediante un'analisi del cariotipo. Questo è uno dei test diagnostici più comunemente utilizzati per identificare anomalie cromosomiche nei settori della oncologia, ginecologia e pediatria. Il metodo si basa sulla cultura di un monostrato di cellule e la successiva analisi al microscopio delle cellule in metafase dopo averle trattate con una sostanza bloccante la fase mitotica. Ciò significa che il cariotipo non è applicabile alle colture tridimensionali, ed è per questo che la stabilità genetica dei preparati osteo-endoteliali è stata analizzata utilizzando un approccio innovativo, chiamato ibridazione genomica comparativa (CGH). Questa è una tecnica citogenetica molecolare basata sull'estrazione del DNA dalle cellule e la successiva identificazione di eventuali variazioni nel numero di coppie di geni distribuiti in tutto il genoma. Questo metodo consente di quantificare le cancellazioni e le amplificazioni del gene con una accuratezza superiore al cariotipo, individuando con precisione i domini e i punti delle regioni coinvolte in qualsiasi squilibrio dall'inizio alla fine. Il metodo CGH dimostra la stabilità genetica dei prodotti tridimensionali, confermando che la coltura a lungo termine in presenza di fattori di differenziazione è in grado di indurre cambiamenti strutturali DNA. L'analisi del CGH ha permesso di stabilire la sicurezza genica del prodotto in un potenziale innesto nell'uomo.

Il fine ultimo della rigenerazione ossea in campo odontoiatrico spesso è il posizionamento di un impianto dentale che funga da radice artificiale per la successiva protesizzazione. A tal scopo più rapidamente l'impianto si integra con i tessuti circostanti, più la procedura protesica si può concludere velocemente e in modo predicibile. Negli ultimi anni molta importanza viene data alla superficie implantare nell'ottica di favorire una rapida ed efficace osteointegrazione. Le superfici di ultima generazione sono micro e nanostrutturate cercando di ottenere un'adesione diretta con le cellule e il tessuto osseo. E' stata sviluppata una

superficie di titanio convenzionale cui è stato aggiunto un trattamento ionizzante. Dalle analisi effettuate si è potuto dimostrare la sicurezza genetica che tale trattamento consente di raggiungere quando vengano seminate e coltivate delle cellule staminali a contatto con la superficie. Sia l'analisi del cariotipo che il CGH non mostrano segni di alterazioni genetiche. Dall'analisi al SEM la disposizione delle cellule a contatto con la superficie trattata è migliore rispetto alla superficie controllo e i risultati della PCR evidenziano come alle cellule a contatto con la superficie trattata sia permessa una differenziazione in senso osteoblastico. L'analisi con PCR ha evidenziato l'espressione di componenti della matrice ossea, osteopontina, osteonectina, e osteocalcina che sono fondamentali per l'interazione tra la matrice extracellulare e le cellule, ed essenziali per la mineralizzazione della matrice. La composizione appropriata della matrice extracellulare è stata anche confermata dalla espressione di collagene di tipo I, che è essenziale per la formazione e la maturazione dei cristalli di idrossiapatite. La differenziazione osteogenica è stata anche accertata valutando l'espressione dei fattori di trascrizione RUNX2 e PPAR γ . La differenziazione delle MSC è governata dalla espressione e/o attivazione di questi fattori di trascrizione: RUNX2 determina la loro differenziazione in osteoblasti, mentre PPAR γ chiede loro differenziazione in adipociti. PPAR γ ha un ruolo importante nel metabolismo osseo (Vicicca et al., 2010). Si facilita l'adipogenesi a scapito dell'osteogenesi, soprattutto inibendo la funzione di RUNX2 e riducendo il numero di osteoblasti nel midollo osseo. Viceversa, un aumento dell'espressione RUNX2 inibisce l'adipogenesi e favorisce l'osteogenesi (Kawai et al., 2009). In presenza di fattori osteogenici, le colture tridimensionali rivelano un graduale aumento dell'espressione RUNX2 coincidente con una marcata riduzione nell'espressione di PPAR γ , confermando che la differenziazione osteogenica avviene a scapito della differenziazione adipogenica. Dal punto di vista sociale, il poter utilizzare biomateriali sostitutivi dell'osso autologo, membrane naturali o sintetiche e superfici implantari che migliorino l'osteointegrazione, sarebbe una grande rivoluzione per tutte le ragioni biologiche precedentemente citate. Più pazienti sarebbero in grado di beneficiare delle tecniche di rigenerazione ossea, eliminando i problemi di edentulismo e anche quelli relativi al prelievo di osso da siti intra o extra orale e della morbidità associata. Ultimo ma non meno importante, ci sarebbero vantaggi sia dal punto di vista del clinico per i pazienti che in termini di tempi e conseguenti costi di tali

trattamenti. Infatti in odontoiatria, la bioingegneria dei tessuti potrebbe essere presa in considerazione come una nuova frontiera nella rigenerazione dei tessuti orali mancanti. (Kaigler and Mooney, 2001; Koyano, 2012). I nostri risultati sono confrontabili con altre ricerche dove la bioingegneria dei tessuti con cellule staminali è già stata applicata in studi clinici con dimostrata efficacia nella rigenerazione del tessuto osseo oro-facciale. (Kaigler et al., 2013; Ueda et al., 2008; Yamada et al., 2006; Yamada et al., 2008).

Conclusioni

Oggi, la terapia implantare è considerata una soluzione estremamente affidabile per sostituire i denti mancanti. L'introduzione di impianti osteointegrati in odontoiatria ha rappresentato un punto di svolta nella pratica clinica odontoiatrica nella riabilitazione di pazienti parzialmente o totalmente edentuli. Le aspettative di un paziente per la riabilitazione protesica sono sempre più alte, soprattutto per quanto riguarda la qualità della vita, la funzione e l'estetica. Tuttavia, il posizionamento di impianti dentali di lunghezza standard non è sempre possibile. Come principio generale per la chirurgia implantare, le superfici degli impianti dovrebbero essere circondate da osso alveolare. A volte, a causa di limitazioni protesiche o anatomiche della cresta alveolare, non è possibile inserire opportunamente gli impianti nell'osso. Esistono diversi metodi per la ricostruzione di difetti dell'osso alveolare, la il principale è la rigenerazione guidata dell'osso (GBR). Nella maggior parte dei casi di GBR, le membrane utilizzate sono supportate da materiali riempitivi costituiti da allotrapianti, materiali sintetici o xenotrapianti. La creazione di tessuti complessi ed organi è l'obiettivo finale dell'ingegneria dei tessuti, che richiede lo sviluppo controllato spazialmente di più tipi di cellule all'interno di uno scaffold di biomateriale. L'attuale possibilità di trapiantare direttamente cellule staminali (SC) adulte in vivo per il trattamento di diverse malattie o di siti lesionati è in evoluzione. I recenti progressi nel campo delle nanotecnologie e una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che controllano la differenziazione ci hanno portato ad unire scaffold biocompatibili con SC adulte. Per trasferire l'utilizzo delle SC dal laboratorio di ricerca alle applicazioni cliniche, ci sarà sempre più bisogno di sistemi di coltura solidi che controllino costantemente la crescita e la differenziazione delle SC.

Il tessuto adiposo è stato usato come fonte di cellule (ADSC) facilmente disponibile per la generazione di una struttura 3D con caratteristiche sia osteogeniche che vascolari. L'analisi dell'espressione genica per i marcatori osteogenici indica il differenziamento delle cellule verso il fenotipo osteogenico. La Real-time PCR ha confermato la presenza di componenti della matrice extracellulare, come osteonectina e osteocalcina, che svolgono un ruolo fondamentale nell'interazione delle cellule con la matrice ossea e nella mineralizzazione della matrice. L'espressione del collagene di tipo I, che è essenziale per la formazione e la

maturazione dei cristalli di idrossiapatite, è chiaramente rilevabile, confermando la corretta composizione della matrice extracellulare. Nelle colture parallele contenenti fattori vascolari, le ADSC si differenziano in cellule endoteliali, come conferma l'espressione di marcatori di superficie, come CD31, e fattori solubili specifici endoteliali, come il fattore di von Willebrand.

Negli ultimi anni, rapidi sviluppi delle nanotecnologie hanno prodotto molti benefici clinici, in particolare nel campo dell'ingegneria del tessuto osseo. Il vantaggio principale è che diversi nuovi biomateriali possono essere fabbricati in nanostrutture che imitano l'osso in struttura e in composizione. L'ottimizzazione delle caratteristiche superficiali dei biomateriali ha fortemente migliorato il comportamento cellulare in termini di adesione, proliferazione, differenziazione e formazione di tessuto nelle tre dimensioni. Tuttavia, ulteriori studi devono essere ancora fatti in modo da identificare la migliore combinazione di biomateriali, cellule e soluzioni tecniche per la creazione del sistema appropriato per applicazioni mediche specifiche. Per raggiungere questo obiettivo, sarà richiesta l'effettiva collaborazione di medici, biologi, chimici, bioingegneri e scienziati dei materiali.

Sono ancora valide le preoccupazioni riguardanti l'uso di nanoparticelle impiegate nella differenziazione delle SC e la protezione delle molecole bioattive contro il degrado ambientale. Inoltre, è essenziale controllare meglio e in maniera più corretta i fattori forniti in termini di dosi e di tempo. Meccanismi di apporto delle molecole sono stati sviluppati per offrire miglioramenti nell'utilizzo delle SC, come la capacità di migliorare la differenziazione e la stabilità della SC. Tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini per determinare meglio le concentrazioni terapeutiche, le combinazioni di molecole e le modalità di rilascio controllato di fattori. Recenti progressi della biotecnologia, della biologia, della chimica dei polimeri e delle nanotecnologie stanno aprendo interessanti possibilità per il miglioramento e il ripristino della funzionalità dei tessuti, riducendo al minimo gli effetti negativi e migliorando la compliance del paziente.

Si è evidenziata l'importanza delle modifiche delle superfici implantari. Al giorno d'oggi, c'è ancora poca prova dei benefici a lungo termine delle nanostrutturazioni, così come i promettenti risultati ottenuti in vitro e su animali devono ancora essere confermati nell'uomo. Inoltre, una complicanza nella manipolazione di nanoparticelle è determinata dai molti cambiamenti chimici sulla superficie del

materiale e può essere molto difficile studiare gli effetti positivi o negativi indotti. Sviluppi in corso suggeriscono che i produttori di impianti dentali investiranno risorse crescenti per dare ai pazienti il materiale più resistente e più biocompatibile per sostituire i denti.

Bibliografia

Aalam AA Center for advanced periodontal & implant therapy. Los Angeles, CA.

Albrektsson T, Johansson C (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 10 Suppl 2(S96-101).

Araujo MG, Lindhe J (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of clinical periodontology* 32(2):212-218.

Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA (1996). Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical orthopaedics and related research* 329:300-309.

Badylak SF, Taylor D, Uygun K (2011). Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual review of biomedical engineering* 13(27-53).

Badylak SF (2014). Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response. *Annals of biomedical engineering* 42(7):1517-1527.

Balasundaram G, Webster TJ (2007). An overview of nano-polymers for orthopedic applications. *Macromolecular bioscience* 7(5):635-642.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S *et al.* (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* 30(1):42-48.

Bauer TW, Muschler GF (2000). Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical orthopaedics and related research* 371:10-27.

Bjorn H, Hollender L, Lindhe J (1965). Tissue regeneration in patients with periodontal disease. *Odontologisk revy* 16(4):317-326.

Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA (2008). Stem cells for tooth engineering. *European cells & materials* 16(1-9).

Boskey AL (1998). Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *Journal of cellular biochemistry Supplement* 30-31(83-91).

Boskey AL (2003). Biomineralization: an overview. *Connective tissue research* 44 Suppl 1(5-9).

Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O *et al.* (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery Supplementum* 16(1-132).

Bressan E, Paniz G, Lops D, Corazza B, Romeo E, Favero G (2011). Influence of abutment material on the gingival color of implant-supported all-ceramic restorations: a prospective multicenter study. *Clinical oral implants research* 22(6):631-637.

Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D *et al.* (2012). Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. *PloS one* 7(11):e49146.

Brito C, Tenenbaum HC, Wong BK, Schmitt C, Nogueira-Filho G (2014). Is keratinized mucosa indispensable to maintain peri-implant health? A systematic review of the literature. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 102(3):643-650.

C O (2011). Bone Substitutes and Validation: Prof. Ilser Turkyilmaz.

Campoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF (1998). Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* 19(23):2101-2127.

Caneva M, Botticelli D, Morelli F, Cesaretti G, Beolchini M, Lang NP (2012). Alveolar process preservation at implants installed immediately into extraction sockets using deproteinized bovine bone mineral - an experimental study in dogs. *Clinical oral implants research* 23(7):789-796.

Caneva M, Botticelli D, Vigano P, Morelli F, Rea M, Lang NP (2013). Connective tissue grafts in conjunction with implants installed immediately into extraction sockets. An experimental study in dogs. *Clinical oral implants research* 24(1):50-56.

Caplan AI, Reuben D, Haynesworth SE (1998). Cell-based tissue engineering therapies: the influence of whole body physiology. *Advanced drug delivery reviews* 33(1-2):3-14.

Caplan AI (2000a). Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue engineering* 6(1):1-8.

Caplan AI (2000b). Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clinical orthopaedics and related research* 379 Suppl):S67-70.

Caplan AI (2002). In vivo remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 961(307-308).

Cecchinato D, Parpaiola A, Lindhe J (2014). Mucosal inflammation and incidence of crestal bone loss among implant patients: a 10-year study. *Clinical oral implants research* 25(7):791-796.

Chen VJ, Smith LA, Ma PX (2006). Bone regeneration on computer-designed nano-fibrous scaffolds. *Biomaterials* 27(21):3973-3979.

Chen XL, Li ZL, Zhang WB, Ye ZC, Ke SN (2007). [Experimental study of maxillary sinus lifting with tissue engineered bone]. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology* 42(10):610-613.

Cohen MM, Jr. (1995). Perspectives on craniofacial asymmetry. III. Common and/or well-known causes of asymmetry. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 24(2):127-133.

Cowin S (2001). *The Bone Mechanics Handbook* FL: Boca Raton.

Curtis DA, Plesh O, Miller AJ, Curtis TA, Sharma A, Schweitzer R *et al.* (1997). A comparison of masticatory function in patients with or without reconstruction of the mandible. *Head & neck* 19(4):287-296.

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A *et al.* (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell death and differentiation* 14(6):1162-1171.

Davis RE, Telischi FF (1995). Traumatic facial nerve injuries: review of diagnosis and treatment. *The Journal of cranio-maxillofacial trauma* 1(3):30-41.

De Long WG, Jr., Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R *et al.* (2007). Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 89(3):649-658.

de Vicente JC, Hernandez-Vallejo G, Brana-Abascal P, Pena I (2010). Maxillary sinus augmentation with autologous bone harvested from the lateral maxillary wall combined with bovine-derived hydroxyapatite: clinical and histologic observations. *Clinical oral implants research* 21(4):430-438.

Denizot F, Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods* 89(2):271-277.

Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P (2002). The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells, tissues, organs* 170(2-3):73-82.

Dhandayuthapani B, Krishnan UM, Sethuraman S (2010). Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 94(1):264-272.

Di Bello C BA (2009). *Interazione tra biomateriali e tessuti* Bologna: Pàtron Editore.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P *et al.* (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99(10):3838-3843.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV (2011a). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine* 9(66).

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV (2011b). Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* 42 Suppl 2(S3-15).

Dogan A, Ozdemir A, Kubar A, Oygur T (2002). Assessment of periodontal healing by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in artificial furcation defects in a dog: a pilot study. *Tissue engineering* 8(2):273-282.

Dogan A, Ozdemir A, Kubar A, Oygur T (2003). Healing of artificial fenestration defects by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in a dog: a preliminary study. *Tissue engineering* 9(6):1189-1196.

Dosunmu OO, Chase GG, Kataphinan W, Reneker DH (2006). Electrospinning of polymer nanofibres from multiple jets on a porous tubular surface. *Nanotechnology* 17(4):1123-1127.

Duan B, Wang M, Zhou WY, Cheung WL, Li ZY, Lu WW (2010). Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia* 6(12):4495-4505.

Elisseeff J, McIntosh W, Fu K, Blunk BT, Langer R (2001). Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 19(6):1098-1104.

Elsdale T, Bard J (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *The Journal of cell biology* 54(3):626-637.

English K (2013). Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and cell biology* 91(1):19-26.

Esposito M, Grusovin MG, Willings M, Coulthard P, Worthington HV (2007). The effectiveness of immediate, early, and conventional loading of dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 22(6):893-904.

F Martini MT, R Tallitsch (2012). Anatomia Umana: EdiSES.

Feng Z, Weinberg A (2006). Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000* 40(50-76).

Ferrus J, Cecchinato D, Pjetursson EB, Lang NP, Sanz M, Lindhe J (2010). Factors influencing ridge alterations following immediate implant placement into extraction sockets. *Clinical oral implants research* 21(1):22-29.

Finkemeier CG (2002). Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 84-A(3):454-464.

Fonzi L (2003). Anatomia Funzionale e Clinica dello Splancnocranio: Edi Ermes.

Foster K, Greenhalgh D, Gamelli RL, Mazingo D, Gibran N, Neumeister M *et al.* (2008). Efficacy and safety of a fibrin sealant for adherence of autologous skin grafts to burn wounds: results of a phase 3 clinical study. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 29(2):293-303.

Francetti L, Corbella S, Taschieri S, Cavalli N, Del Fabbro M (2013). Medium- and Long-Term Complications in Full-Arch Rehabilitations Supported by Upright and Tilted Implants. *Clinical implant dentistry and related research.*

Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D, Pegas Henriques JA (2009). Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation; research in biological diversity* 77(3):221-228.

Francois M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20(1):187-195.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3(4):393-403.

Garcia-Godoy F, Murray PE (2006). Status and potential commercial impact of stem cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration. *Stem cells and development* 15(6):881-887.

Gardin C, Vindigni V, Bressan E, Ferroni L, Nalesso E, Puppa AD *et al.* (2011). Hyaluronan and fibrin biomaterial as scaffolds for neuronal differentiation of adult

stem cells derived from adipose tissue and skin. *International journal of molecular sciences* 12(10):6749-6764.

Gardin C, Bressan E, Ferroni L, Nalesso E, Vindigni V, Stellini E *et al.* (2012a). In vitro concurrent endothelial and osteogenic commitment of adipose-derived stem cells and their genetical analyses through comparative genomic hybridization array: novel strategies to increase the successful engraftment of tissue-engineered bone grafts. *Stem cells and development* 21(5):767-777.

Gardin C, Ferroni L, Favero L, Stellini E, Stomaci D, Sivoletta S *et al.* (2012b). Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *International journal of molecular sciences* 13(1):737-757.

Genco RJ (1992). Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of periodontology* 63(4 Suppl):338-355.

Gotman I (1997). Characteristics of metals used in implants. *Journal of endourology / Endourological Society* 11(6):383-389.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25):13625-13630.

Guler AU, Sumer M, Sumer P, Bicer I (2005). The evaluation of vertical heights of maxillary and mandibular bones and the location of anatomic landmarks in panoramic radiographs of edentulous patients for implant dentistry. *Journal of oral rehabilitation* 32(10):741-746.

Haas R, Haidvogel D, Dortbudak O, Mailath G (2002). Freeze-dried bone for maxillary sinus augmentation in sheep. Part II: biomechanical findings. *Clinical oral implants research* 13(6):581-586.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13(1):69-80.

Helary C, Abed A, Mosser G, Louedec L, Meddahi-Pelle A, Giraud-Guille MM (2011). Synthesis and in vivo integration of improved concentrated collagen hydrogels. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 5(3):248-252.

Hotta T, Yokoo S, Terashi H, Komori T (2007). Clinical and histopathological analysis of healing process of intraoral reconstruction with ex vivo produced oral mucosa equivalent. *The Kobe journal of medical sciences* 53(1-2):1-14.

Huang GT (2009). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative medicine* 4(5):697-707.

Hunt JA, Hobar PC (2003). Common craniofacial anomalies: conditions of craniofacial atrophy/hypoplasia and neoplasia. *Plastic and reconstructive surgery* 111(4):1497-1508; quiz 1509-1410.

Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M (2003). Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 32(2):188-197.

Jia H, Zhu G, Vugrinovich B, Kataphinan W, Reneker DH, Wang P (2002). Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnology progress* 18(5):1027-1032.

Jin Q, Wei G, Lin Z, Sugai JV, Lynch SE, Ma PX *et al.* (2008). Nanofibrous scaffolds incorporating PDGF-BB microspheres induce chemokine expression and tissue neogenesis in vivo. *PloS one* 3(3):e1729.

Jin QM, Anusaksathien O, Webb SA, Rutherford RB, Giannobile WV (2003a). Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *Journal of periodontology* 74(2):202-213.

Jin QM, Zhao M, Webb SA, Berry JE, Somerman MJ, Giannobile WV (2003b). Cementum engineering with three-dimensional polymer scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A* 67(1):54-60.

Kadota C, Sumita YI, Wang Y, Otomaru T, Mukohyama H, Fueki K *et al.* (2008). Comparison of food mixing ability among mandibulectomy patients. *Journal of oral rehabilitation* 35(6):408-414.

Kahn SA, Beers RJ, Lentz CW (2011). Use of acellular dermal replacement in reconstruction of nonhealing lower extremity wounds. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 32(1):124-128.

Kaigler D, Mooney D (2001). Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of dental education* 65(5):456-462.

Kaigler D, Pagni G, Park CH, Tarle SA, Bartel RL, Giannobile WV (2010). Angiogenic and osteogenic potential of bone repair cells for craniofacial regeneration. *Tissue engineering Part A* 16(9):2809-2820.

Kaigler D, Pagni G, Park CH, Braun TM, Holman LA, Yi E *et al.* (2013). Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial. *Cell transplantation* 22(5):767-777.

Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H *et al.* (2004). Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of periodontology* 75(9):1281-1287.

Kawai M, Devlin MJ, Rosen CJ (2009). Fat targets for skeletal health. *Nature reviews Rheumatology* 5(7):365-372.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells* 24(5):1294-1301.

Kerr EN, Mealey BL, Noujeim ME, Lasho DJ, Nummikoski PV, Mellonig JT (2008). The effect of ultrasound on bone dimensional changes following extraction: a pilot study. *Journal of periodontology* 79(2):283-290.

Khan SN, Cammisa FP, Jr., Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM (2005). The biology of bone grafting. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 13(1):77-86.

Kinane DF, Bartold PM (2007). Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontology 2000* 43(278-293).

Klinge B, Meyle J, Working G (2012). Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012. *Clinical oral implants research* 23 Suppl 6(108-110).

Koyano K (2012). Toward a new era in prosthodontic medicine. *Journal of prosthodontic research* 56(1):1-2.

Krekeler G, Schilli W, Diemer J (1985). Should the exit of the artificial abutment tooth be positioned in the region of the attached gingiva? *International journal of oral surgery* 14(6):504-508.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F *et al.* (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20(8):1394-1402.

Lang NP, Berglundh T, Working Group 4 of Seventh European Workshop on P (2011). Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology* 38 Suppl 11(178-181).

Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* 260(5110):920-926.

Lekic PC, Rajshankar D, Chen H, Tenenbaum H, McCulloch CA (2001). Transplantation of labeled periodontal ligament cells promotes regeneration of alveolar bone. *The Anatomical record* 262(2):193-202.

Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ (2001). Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 98(5):1289-1297.

Lewandowska-Szumiel M, Komender J (2000). Interaction between tissues and implantable materials. *Frontiers of medical and biological engineering : the international journal of the Japan Society of Medical Electronics and Biological Engineering* 10(2):79-82.

Lindhe J, Nyman S, Karring T (1984). Connective tissue reattachment as related to presence or absence of alveolar bone. *Journal of clinical periodontology* 11(1):33-40.

Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C (1992). Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clinical oral implants research* 3(1):9-16.

Lindhe J (2009). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*: John Wiley & Sons.

Liu X, Ma PX (2004). Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of biomedical engineering* 32(3):477-486.

Lops D, Bressan E, Pisoni G, Cea N, Corazza B, Romeo E (2012). Short implants in partially edentulous maxillae and mandibles: a 10 to 20 years retrospective evaluation. *International journal of dentistry* 2012(351793).

Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL (2009). Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue engineering Part B, Reviews* 15(3):353-370.

Ma PX, Zhang R (1999). Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of biomedical materials research* 46(1):60-72.

Ma PX (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews* 60(2):184-198.

Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT *et al.* (2006). Craniofacial tissue engineering by stem cells. *Journal of dental research* 85(11):966-979.

Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL (2002). Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 3(2):232-238.

McGuire MK, Nunn ME (2005). Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast-derived dermal substitute. I. Comparison to the gingival autograft: a randomized controlled pilot study. *Journal of periodontology* 76(6):867-880.

McGuire MK, Scheyer ET (2007). A randomized, double-blind, placebo-controlled study to determine the safety and efficacy of cultured and expanded autologous fibroblast injections for the treatment of interdental papillary insufficiency associated with the papilla priming procedure. *Journal of periodontology* 78(1):4-17.

McGuire MK, Scheyer ET, Nunn ME, Lavin PT (2008). A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *Journal of periodontology* 79(10):1847-1856.

McGuire MK, Scheyer ET, Nevins ML, Neiva R, Cochran DL, Mellonig JT *et al.* (2011). Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva: results

from a randomized, within-patient, controlled trial. *Journal of periodontology* 82(10):1414-1423.

Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews* 20(5-6):419-427.

Min SK, Lee SC, Hong SD, Chung CP, Park WH, Min BM (2010). The effect of a laminin-5-derived peptide coated onto chitin microfibers on re-epithelialization in early-stage wound healing. *Biomaterials* 31(17):4725-4730.

Misch CE (2008). *Contemporary Implant Dentistry* St. Louis: Mosby.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG *et al.* (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(10):5807-5812.

Morelli T, Neiva R, Nevins ML, McGuire MK, Scheyer ET, Oh TJ *et al.* (2011). Angiogenic biomarkers and healing of living cellular constructs. *Journal of dental research* 90(4):456-462.

Moroni L, de Wijn JR, van Blitterswijk CA (2008). Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 19(5):543-572.

Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C *et al.* (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 24(2):155-165.

Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremoto K, Matsuno T, Tabata Y *et al.* (2004). In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue engineering* 10(3-4):537-544.

Nakanishi Y, Izumi K, Yoshizawa M, Saito C, Kawano Y, Maeda T (2007). The expression and production of vascular endothelial growth factor in oral mucosa equivalents. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 36(10):928-933.

Nauta AJ, Fibbe WE (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110(10):3499-3506.

Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K *et al.* (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine* 15(1):42-49.

Ogunsalu (2011). Bone Substitutes and Validation. Implant dentistry- The most promising discipline of dentistry: Ilser Turkyilmaz.

Oikarinen K, Raustia AM, Hartikainen M (1995). General and local contraindications for endosseal implants--an epidemiological panoramic radiograph study in 65-year-old subjects. *Community dentistry and oral epidemiology* 23(2):114-118.

Orlando G, Wood KJ, Stratta RJ, Yoo JJ, Atala A, Soker S (2011). Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. *Transplantation* 91(12):1310-1317.

Paletta JR, Bockelmann S, Walz A, Theisen C, Wendorff JH, Greiner A *et al.* (2010). RGD-functionalisation of PLLA nanofibers by surface coupling using plasma treatment: influence on stem cell differentiation. *Journal of materials science Materials in medicine* 21(4):1363-1369.

Pape HC, Evans A, Kobbe P (2010). Autologous bone graft: properties and techniques. *Journal of orthopaedic trauma* 24 Suppl 1(S36-40).

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9):e45.

Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A *et al.* (2010). Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials* 31(13):3527-3535.

Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP (1994). Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clinical oral implants research* 5(4):254-259.

Pountos I, Giannoudis PV (2005). Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 36 Suppl 3(S8-S12).

Pramstraller M, Farina R, Franceschetti G, Pramstraller C, Trombelli L (2011). Ridge dimensions of the edentulous posterior maxilla: a retrospective analysis of a cohort of 127 patients using computerized tomography data. *Clinical oral implants research* 22(1):54-61.

Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V (2007). Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* 82(4):887-893.

Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y *et al.* (2012). Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem cells translational medicine* 1(1):51-58.

Rice MA, Dodson BT, Arthur JA, Anseth KS (2005). Cell-based therapies and tissue engineering. *Otolaryngologic clinics of North America* 38(2):199-214, v.

Rodan GA, Noda M (1991). Gene expression in osteoblastic cells. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 1(2):85-98.

Rodan GA (1992). Introduction to bone biology. *Bone* 13 Suppl 1(S3-6).

Roddy GW, Oh JY, Lee RH, Bartosh TJ, Ylostalo J, Coble K *et al.* (2011). Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF-alpha stimulated gene/protein 6. *Stem cells* 29(10):1572-1579.

Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S (2006). Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors. *Journal of clinical periodontology* 33(4):283-289.

Saglam AA (2002). The vertical heights of maxillary and mandibular bones in panoramic radiographs of dentate and edentulous subjects. *Quintessence international* 33(6):433-438.

Sanz-Herrera JA, Doblare M, Garcia-Aznar JM (2010). Scaffold microarchitecture determines internal bone directional growth structure: a numerical study. *Journal of biomechanics* 43(13):2480-2486.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T (2003). Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 23(4):313-323.

Sciadini MF, Johnson KD (2000). Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 18(2):289-302.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J *et al.* (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364(9429):149-155.

Seyedjafari E, Soleimani M, Ghaemi N, Sarbolouki MN (2011). Enhanced osteogenic differentiation of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells on

electrospun nanofibers. *Journal of materials science Materials in medicine* 22(1):165-174.

Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P *et al.* (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell research* 20(5):510-518.

Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C, Rosenlicht JL, Tatum OH, Jr. *et al.* (1992). Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dental clinics of North America* 36(1):151-186; discussion 187-158.

Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX (2009). Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology* 1(2):226-236.

Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI (1999). Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 17(2):205-213.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C *et al.* (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one* 1(e79).

Susarla SM, Swanson E, Gordon CR (2011). Craniomaxillofacial reconstruction using allotransplantation and tissue engineering: challenges, opportunities, and potential synergy. *Annals of plastic surgery* 67(6):655-661.

Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules* 47(1):1-4.

Taba M, Jr., Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV (2005). Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthodontics & craniofacial research* 8(4):292-302.

Tallgren A (1972). The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: a mixed-longitudinal study covering 25 years. *The Journal of prosthetic dentistry* 27(2):120-132.

Thompson DF, Letassy NA, Thompson GD (1988). Fibrin glue: a review of its preparation, efficacy, and adverse effects as a topical hemostat. *Drug intelligence & clinical pharmacy* 22(12):946-952.

Tissue engineering. Selected papers from the UCLA Symposium of Tissue Engineering. Keystone, Colorado, April 6-12, 1990. (1991). *Journal of biomechanical engineering* 113(2):111-207.

Tjellstrom A, Yontchev E, Lindstrom J, Branemark PI (1985). Five years' experience with bone-anchored auricular prostheses. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 93(3):366-372.

Tonetti MS, Mombelli A (1999). Early-onset periodontitis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 4(1):39-53.

Tran N, Webster TJ (2009). Nanotechnology for bone materials. *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology* 1(3):336-351.

Treccani (2010).

Ueda M, Yamada Y, Kagami H, Hibi H (2008). Injectable bone applied for ridge augmentation and dental implant placement: human progress study. *Implant dentistry* 17(1):82-90.

Urken ML, Buchbinder D, Weinberg H, Vickery C, Sheiner A, Parker R *et al.* (1991). Functional evaluation following microvascular oromandibular reconstruction of the oral cancer patient: a comparative study of reconstructed and nonreconstructed patients. *The Laryngoscope* 101(9):935-950.

Valentin JE, Stewart-Akers AM, Gilbert TW, Badylak SF (2009). Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds. *Tissue engineering Part A* 15(7):1687-1694.

Van Heest A, Swiontkowski M (1999). Bone-graft substitutes. *Lancet* 353 Suppl 1(S128-29).

Viccica G, Francucci CM, Marocci C (2010). The role of PPARgamma for the osteoblastic differentiation. *Journal of endocrinological investigation* 33(7 Suppl):9-12.

Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R (2001). Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue engineering* 7(3):291-301.

Wei G, Ma PX (2004). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25(19):4749-4757.

Wei G, Ma PX (2006). Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres. *Journal of biomedical materials research Part A* 78(2):306-315.

Wei G, Jin Q, Giannobile WV, Ma PX (2007). The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials* 28(12):2087-2096.

Wen X, Nie X, Zhang L, Liu L, Deng M (2011). Adipose tissue-deprived stem cells acquire cementoblast features treated with dental follicle cell conditioned medium containing dentin non-collagenous proteins in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 409(3):583-589.

Whitesides GM, Mathias JP, Seto CT (1991). Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science* 254(5036):1312-1319.

Woo KM, Chen VJ, Ma PX (2003). Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *Journal of biomedical materials research Part A* 67(2):531-537.

Woo KM, Jun JH, Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM *et al.* (2007). Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials* 28(2):335-343.

Xie Q, Narhi TO, Nevalainen JM, Wolf J, Ainamo A (1997). Oral status and prosthetic factors related to residual ridge resorption in elderly subjects. *Acta odontologica Scandinavica* 55(5):306-313.

Xu Q, Izumi K, Tobita T, Nakanishi Y, Feinberg SE (2009). Constitutive release of cytokines by human oral keratinocytes in an organotypic culture. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 67(6):1256-1264.

Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S (2006). A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 26(4):363-369.

Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Kohgo T, Hibi H, Nagasaka T *et al.* (2008). Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6-year follow-up. *Tissue engineering Part A* 14(10):1699-1707.

Yen AH, Sharpe PT (2008). Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell and tissue research* 331(1):359-372.

Yu J, Thomson JA (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes & development* 22(15):1987-1997.

Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G *et al.* (2010). Neural potential of adipose stem cells. *Discovery medicine* 10(50):37-43.

Zhang R, Ma PX (2000). Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. *Journal of biomedical materials research* 52(2):430-438.

Zhao M, Jin Q, Berry JE, Nociti FH, Jr., Giannobile WV, Somerman MJ (2004). Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. *Journal of periodontology* 75(1):154-161.

Zouhary KJ (2010). Bone graft harvesting from distant sites: concepts and techniques. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America* 22(3):301-316, v.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H *et al.* (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13(12):4279-4295.