



RAPPORTI ISTISAN 17|40

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Caratterizzazione morfometrica di biomateriali utilizzati in odontostomatologia eseguita tramite analisi microtomografica

R. Bedini, R. Pecci,
F. Mangione, D. Meleo, P. Meli



TECNOLOGIE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Caratterizzazione morfometrica
di biomateriali utilizzati in odontostomatologia
eseguita tramite analisi microtomografica**

Rossella Bedini (a), Raffaella Pecci (a),
Francesca Mangione (b), Deborah Meleo (c), Paola Meli (a)

*(a) Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Paris Descartes Sorbonne Paris

(c) Libero professionista, odontoiatra, Roma

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
17/40

Istituto Superiore di Sanità

Caratterizzazione strutturale e morfometrica di biomateriali utilizzati in odontostomatologia eseguita tramite analisi microtomografica.

Rossella Bedini, Raffaella Pecci, Francesca Mangione, Deborah Meleo, Paola Meli
2017, 44 p. Rapporti ISTISAN 17/40

La presente indagine sperimentale è stata realizzata al fine della la caratterizzazione strutturale e morfometrica di sei biomateriali di diversa origine e composizione e attualmente presenti in commercio. Tale caratterizzazione è stata eseguita tramite acquisizione e analisi microtomografica stabilendo ogni volta i parametri più adeguati ad ogni materiale per una corretta scansione e quindi acquisizione corretta dei dati. I materiali analizzati sono stati dell'osso omologo, della spongiosa equina, della spongiosa bovina, dell'idrossiapatite, del fosfato di calcio, del tricalcio fosfato, per quanto possibile conformato a blocchetto inferiore alle dimensioni di 5 x 5 x 5 mm. Per ogni materiale vengono ottenute immagini delle proiezioni bidimensionali e tramite l'utilizzo di un software specifico sono state ottenute anche le sezioni trasversali per la ricostruzione di immagini tridimensionali e dei parametri morfometrici. I risultati ottenuti hanno mostrato che con l'utilizzo delle informazioni strutturali e morfometriche, fornite dalla microtomografia, è possibile supportare lo sviluppo dell'ingegneria tissutale. È possibile identificare le proprietà dei biomateriali perché fungano non solo da substrato ma anche come mezzi per ospitare cellule staminali e fattori di crescita per la rigenerazione tissutale e quindi monitorare le proprietà del tessuto osseo neoformato sia *in vitro* sia *ex vivo*.

Parole chiave: Biomateriali; Caratterizzazione strutturale; Caratterizzazione morfometrica; Analisi microtomografica

Istituto Superiore di Sanità

Structural and morphometric characterization of biomaterials used in odontostomatology by means of microCT analysis.

Rossella Bedini, Raffaella Pecci, Francesca Mangione, Deborah Meleo, Paola Meli
2017, 44 p. Rapporti ISTISAN 17/40 (in Italian)

This experimental investigation has been performed on six different commercialized biomaterials. Structural and morphometric characterization by microtomography has been carried out, setting each time the best parameters for correct scanning and data acquisition of each biomaterial. The biomaterials analyzed were homologous bone, equine cancellous bone, bovine cancellous bone, hydroxyapatite, calcium phosphate, tricalcium phosphate, all shaped as blocks smaller than 5 x 5 x 5 mm. For each biomaterial, two-dimensional projections obtained were processed by a specific software, and cross sections were also processed for three-dimensional images reconstruction and for morphometric parameters' calculations. The obtained results showed that, microtomographic structural and morphometric information provides support to the development of tissue engineering. Biomaterials' properties were also recognized both as a substrate but also as a mean for hosting stem cells and growth factors, enhancing tissue regeneration and monitoring the properties of *in vitro* and *ex vivo* neoformed bone.

Key words: Biomaterials; Structural characterization; Morphometric characterization; Microtomography analysis

Per informazioni su questo documento scrivere a: rossella.bedini@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Bedini R, Pecci R, Mangione F, Meleo D, Meli P. *Caratterizzazione strutturale e morfometrica di biomateriali utilizzati in odontostomatologia eseguita tramite analisi microtomografica*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (Rapporti ISTISAN 17/40).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Introduzione	1
1. Biologia dell'osso	4
1.1. Generalità.....	4
1.2. Fibre connettivali.....	4
1.3. Sostanza fondamentale.....	5
1.4. Componente minerale.....	5
1.5. Cellule ossee.....	6
1.6. Architettura: tessuto osseo non lamellare e lamellare.....	7
1.7. Istogenesi dell'osso.....	8
1.8. Guarigione ossea.....	9
2. Rigenerazione ossea e biomateriali	11
2.1. Generalità.....	11
2.2. Biomateriali.....	12
2.3. <i>Scaffold</i> e osteoconduzione.....	16
3. Microtomografia tridimensionale computerizzata a raggi X	19
3.1. Generalità.....	19
3.2. Raggi X.....	19
3.3. Skyscan 1072.....	20
3.4. Ricostruzione di un'immagine tomografica.....	21
3.5. Possibilità d'impiego.....	23
3.5.1. Studi sulle caratteristiche meccaniche dell'osso.....	23
3.5.2. Studi sui biomateriali e sulla rigenerazione ossea.....	24
3.6. Ultrastruttura e istomorfometria.....	25
4. Indagine sperimentale	27
4.1. Materiali e metodi.....	27
4.2. Risultati.....	31
4.3. Discussione e conclusioni.....	37
Bibliografia	40

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, si è verificato un prodigioso ampliamento delle conoscenze nel campo della biologia molecolare e delle biotecnologie. Le sempre maggiori acquisizioni hanno reso possibile la nascita di una nuova scienza, definita ingegneria tissutale. L'ingegneria tissutale è la tecnologia che si occupa della rigenerazione di tessuti e organi (1).

Oggi, la sostituzione di tessuti persi richiede ancora e necessariamente l'impianto di protesi artificiali nell'area del difetto (protesi valvolari, protesi articolari, ecc.) o l'innesto di tessuto prelevato da altri pazienti (trapianto omologo) o ricavato da altri siti, nello stesso paziente (innesto autologo) (2).

Grazie all'ingegneria tissutale, si sta avviando una ricerca proficua e tesa alla rigenerazione dei tessuti perduti, attraverso delle rivoluzionarie metodiche, che rappresentano il punto d'arrivo delle più innovative conoscenze di biologia molecolare e delle più moderne tecniche di chirurgia ricostruttiva (2, 3). La rigenerazione rappresenta, infatti, la possibilità di ripristinare la forma e la funzione delle strutture andate perdute, mediante l'induzione, in un soggetto adulto, di fenomeni e meccanismi assai complessi (e per certi versi, non ancora ben noti), tipici dello sviluppo embrionale e della morfogenesi dei tessuti e delle strutture (2, 4, 5).

La scienza della rigenerazione tissutale si prefigge l'obiettivo di ripetere, artificialmente, processi naturali che coinvolgono una serie di fattori molecolari e di segnali in grado di determinare l'architettura di un tessuto (2, 5).

Allo stato attuale, l'ingegneria tissutale trova applicazione anche nello studio dei sostituti ossei, di cui si prefigge di testare e migliorare le proprietà e le caratteristiche.

Dalla medicina riparativa, ovvero dalla sostituzione di organo/tessuto, si è passati alla medicina rigenerativa in cui l'impiego di componenti cellulari supportati da *carrier* o *scaffold* adeguati per la riparazione *in vitro* o *in vivo* di tessuti e organi consente, un miglioramento e una standardizzazione delle tecniche chirurgiche (6). Oggi, la rigenerazione ossea può essere ottenuta e supportata grazie all'impiego dei cosiddetti biomateriali, cioè materiali progettati per interagire con sistemi biologici, per valutare, trattare, incrementare o sostituire tessuti, organi o funzioni corporee (4).

Un biomateriale ideale dovrebbe essere:

- biocompatibile e biotollerabile;
- atossico;
- non cancerogeno o teratogeno;
- non antigenico;
- sterile o sterilizzabile;
- eccellente dal punto di vista biomeccanico;
- totalmente biorassorbibile;
- idrofilico;
- radiopaco;
- economico;
- facilmente manipolabile;
- non stimolante la proliferazione di microrganismi patogeni (3, 6).

I biomateriali possono essere classificati in base alla loro natura in:

- biomateriali di origine biologica;
- biomateriali di sintesi.

Dei biomateriali di origine biologica fanno parte gli innesti d'osso autologo, prelevati dallo stesso paziente, gli innesti d'osso omologo, prelevati da donatore vivente o da cadavere, e gli

innesti d'osso eterologo, prelevati da altre specie. Talune classificazioni, inoltre, menzionano in questo gruppo le idrossiapatiti filogeniche e i coralli, entrambi derivati da alghe marine calcificate.

Al secondo gruppo, invece, appartengono i biovetri, l'idrossiapatite sintetica, i derivati dell'acido poliglicolico e polilattico e il solfato e il fosfato di calcio (2, 7, 8).

Se si analizzano le proprietà dei biomateriali rispetto alla loro influenza sul processo di rigenerazione, è doverosa la distinzione tra:

- biomateriali con azione di osteogenesi;
- biomateriali con azione di osteoinduzione;
- biomateriali con azione di osteoconduzione.

Per osteogenesi si intende la capacità intrinseca dell'innesto di determinare neogenesi ossea, indipendente dal sito donatore. Essa ha luogo, quando viene promossa la formazione e la crescita di nuovo tessuto, da parte di osteoblasti e loro precursori, presenti nel sito di rigenerazione. Cellule con attività osteogenica provengono dal periostio (25-30%), dalla zona intracorticale (20-30%), dal midollo osseo (40-60%) (2, 4, 9, 10).

Per osteoinduzione si intende la capacità dell'innesto di indurre la differenziazione in osteoblasti di cellule mesenchimali indifferenziate totipotenti, provenienti sia dal sito ricevente che dal circolo. Difatti, se l'innesto riceve, precocemente, sostanze nutritive dal coagulo ematico, al suo interno, persistono cellule vitali nonostante il danno anossico, inevitabile nella fase del prelievo. Questa condizione fa sì che vengano rilasciate biomolecole, quali, ad esempio, le proteine che partecipano al metabolismo osseo, le cosiddette *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) e i fattori di crescita (*Growth Factors*, GF), in grado di determinare la comparsa di elementi osteogenici e condrogenici nel sito ricevente e all'interno dello stesso innesto (2, 4, 9, 10).

Per osteoconduzione si intende la capacità dell'innesto di favorire la neoformazione ossea agendo da supporto strutturale tridimensionale. In questo modo, si stabilisce un'interazione tra innesto e sito ricevente che porta all'invasione dell'innesto stesso da parte di vasi sanguigni, accompagnati da cellule progenitrici, prima perifericamente e poi al suo interno, da cui scaturisce una graduale sostituzione con osso neoformato (*creeping substitution*) (2, 4, 9, 10).

Allo stato attuale, soltanto gli innesti ossei di tipo autologo consentono di ottenere, al contempo, osteogenesi, osteoinduzione e osteoconduzione e il loro impiego in chirurgia ossea rigenerativa rappresenta una metodica consolidata.

Sebbene i risultati ottenuti nell'utilizzo dell'osso autologo siano sorprendenti e siano considerati il *gold standard* alcuni limiti quali, la difficoltà di utilizzo per lesioni ossee di grandi dimensioni perché la quantità di materiale disponibile è limitata, la necessità di intervenire su due siti chirurgici con un conseguente aumento delle complicazioni post-chirurgiche (infezioni e dolore) fanno sì che sia sempre più sentita l'esigenza di utilizzare materiali da innesto alternativi.

L'utilizzo di materiali alternativi consentirebbe da un lato di avere maggiori quantitativi a disposizione per il processo rigenerativo e, dall'altro, di ridurre i costi supplementari conseguenti all'allungamento della degenza ospedaliera nonché di ridurre la morbilità post-operatoria dovuta alla necessità di un secondo accesso chirurgico nello stesso individuo (4, 9-11).

Da quanto detto, risultano eclatanti le possibilità offerte dall'ingegneria tissutale e dall'applicazione delle acquisizioni ad essa legate.

Lo scopo della presente trattazione sarà, dunque, lo studio delle proprietà di alcuni biomateriali di differente natura (allogenici, eterologhi e alloplastici) attraverso un'analisi microtomografica, condotta con la strumentazione Skyscan 1072.

In questa sede, verranno messi in luce gli stretti legami esistenti tra caratteristiche microarchitetturali e proprietà biologiche dei suddetti materiali, ricavando i principali parametri morfometrici ed evidenziando, allo stesso tempo, i vantaggi che la microtomografia offre nella

loro identificazione, rispetto ad altre metodiche d'analisi come la microscopia ottica ed elettronica.

1. BIOLOGIA DELL'OSSO

1.1. Generalità

Il tessuto osseo è una forma specializzata di tessuto connettivo, caratterizzata dalla mineralizzazione della matrice extracellulare. Nonostante la sua durezza e resistenza alla pressione e alla trazione, l'osso è molto leggero; tale associazione tra massima resistenza e minimo peso è uno degli attributi più importanti dell'osso ed è dovuta alla sua straordinaria struttura interna (12).

Il tessuto osseo costituisce lo scheletro che rappresenta la struttura interna del nostro corpo, in grado di dare protezione agli organi interni e di dare inserzione a muscoli e tendini.

Accoglie, inoltre, nelle sue cavità gli elementi emopoietici del midollo.

Oltre alle funzioni meccaniche il tessuto osseo funge anche da riserva di calcio, dalla quale lo ione Ca^{2+} è continuamente mobilizzato per il mantenimento dell'equilibrio omeostatico dell'organismo.

Il tessuto osseo è costituito da cellule e da una matrice intercellulare organica e inorganica nonché da acqua per circa il 10%.

La matrice organica è composta da fibre collagene e da una sostanza amorfa nella cui costituzione entrano proteine non collageniche e proteoglicani. Le fibre collagene rappresentano la componente organica prevalente dell'osso. La matrice inorganica è costituita principalmente da fosfato e carbonato di calcio e rappresenta il 65 per cento circa del peso secco dell'osso (4, 10, 12).

1.2. Fibre connettivali

Le fibre connettivali sono rappresentate per la quasi totalità da fibre collagene, composte da collagene di tipo I (12).

Un importante tessuto connettivo è quello della membrana del periostio; esso riveste la superficie ossea, cui aderisce attraverso fibre collagene perforanti dette fibre di Sharpey e attraverso i capillari propri dello strato periosteale. Nello spessore del periostio, sono riscontrabili uno strato esterno, o fibroso, e uno strato interno ricco di cellule, contenente un'estesa rete capillare e alcune fibre elastiche. Lo strato più profondo, invece, mostra delle caratteristiche variabili a seconda dello stato funzionale dell'osso; durante lo sviluppo fetale e postnatale e nel corso di processi riparativi di fratture, si riscontra, sulla sua superficie interna, uno strato epitelioidale continuo di osteoblasti in attiva proliferazione e con proprietà osteogeniche (strato osteogenico di Ollier o strato cambiale). Nell'adulto, gli osteoblasti perdono le loro caratteristiche citologiche ed entrano in uno stato di quiescenza non definitivo, poiché in caso di lesioni, assumono di nuovo la loro potenzialità osteoformativa e iniziano un'azione di neoformazione di sostanza ossea (2, 12-14).

Le cavità midollari e gli spazi vascolari, sono rivestite dall'endostio, membrana connettivale riccamente vascolarizzata costituita da un unico strato di cellule che, durante lo sviluppo e la crescita, sono osteoblasti attivi con funzione osteoformativa e si trasformano in cellule osteoprogenitrici, nell'adulto (1, 2, 12-14).

1.3. Sostanza fondamentale

La sostanza fondamentale ha una composizione differente rispetto a quella degli altri tessuti connettivi. Essa è composta da proteoglicani e glicoproteine. I proteoglicani sono degli aggregati di glicosamminoglicani acidi, uniti assieme da brevi catene proteiche. Le glicoproteine, invece, sono molecole diverse, di solito fosforilate o solfatate, riconducibili all'osteonectina, la fosfatasi alcalina e la fibronectina. La prima è la più abbondante, presenta elevata affinità per il calcio e si ritiene che agisca come elemento di nucleazione dei cristalli minerali; la seconda è un enzima assai abbondante nel tessuto osseo e sembra essere coinvolta nei processi di maturazione e sintesi della matrice organica dell'osso; la terza è una molecola di adesione, localizzata, prevalentemente, nella matrice pericellulare e capace di legarsi al collagene. Si pensa sia coinvolta nei processi di migrazione, adesione alla matrice e organizzazione delle cellule dell'osso (2, 12-14).

Alle glicoproteine e ai proteoglicani si associano le sialoproteine e le proteine contenenti l'acido gamma-carbossiglutammino (proteine GLA).

Alle sialoproteine appartiene, ad esempio, l'osteopontina, che sembra essere coinvolta nell'adesione cellulare alla matrice ossea (2, 12-14).

Delle proteine GLA fanno parte, invece, la proteina GLA dell'osso od osteocalcina, che inibisce i processi di mineralizzazione, legandosi al calcio e rendendolo indisponibile, e la proteina GLA della matrice, il cui ruolo biologico è da chiarirsi, ma che risulta essere sia nell'osso maturo e in via di formazione, sia nella cartilagine di accrescimento, in fase di sostituzione da parte del tessuto osseo (2, 12).

1.4. Componente minerale

La componente minerale è rappresentata da cristalli di sali di calcio, prevalentemente fosfato di calcio, cui si aggiungono quantità minori di carbonato di calcio e tracce di altri sali (fluoruro di calcio, fosfato di magnesio).

Il fosfato di calcio è presente sotto forma di cristalli di apatite, la cui cella elementare ha la forma di un prisma esagonale appiattito a formula chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{4-}$; le due cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni idrossile (OH^-), formando, così, l'idrossiapatite.

Il cristallo origina dall'ampliamento delle singole celle elementari e ha un ago lungo e sottile, spesso circa 2 nm e lungo 40 nm (2, 15).

I cristalli di apatite tendono a disporsi parallelamente tra sé e le microfibrille collagene, di cui ricoprono la superficie e permeano le porosità. Durante il processo di mineralizzazione dell'osso il fosfato di calcio precipita inizialmente sotto forma di minutissimi aggregati amorfi.

Questi nuclei iniziali di concrezione minerale vengono rimpiazzati, rapidamente, da sottilissimi cristalli aghiformi, disposti parallelamente a molecole filamentose della sostanza fondamentale, detti filamenti assili o *chrystal ghosts*, verosimilmente costituiti da decorina (proteoglicano), in rapporto al periodo delle microfibrille collagene.

Una volta formati i cristalli di apatite, la deposizione di nuovo minerale può avvenire sia per formazione di nuovi cristalli che per apposizione sui preesistenti. Tale fenomeno è finemente regolato dalle cellule ossee tramite la produzione di specifiche molecole della matrice (12, 16).

1.5. Cellule ossee

Le cellule del tessuto osseo sono morfologicamente distinguibili in quattro varietà: le cellule progenitrici, gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti.

Le cellule osteoprogenitrici hanno l'aspetto di cellule blastiche, poco differenziate e si collocano sulla superficie libera delle ossa nello strato più interno del periostio (strato di Ollier) e nell'endostio, in prossimità dei vasi sanguigni. La loro spiccata capacità proliferativa si manifesta, in particolar modo, durante l'accrescimento corporeo ma può manifestarsi anche durante la vita adulta. Esse sono in grado di produrre e secernere le proteine ossee morfogenetiche, BMP, fattori di crescita e di differenziamento autocrini che si differenziano in osteoblasti (2, 16).

Gli osteoblasti sono le cellule primariamente responsabili della sintesi della sostanza intercellulare e della sua mineralizzazione.

Gli osteoblasti hanno dimensioni rilevanti (circa 20 μm) e si uniscono tra loro e con gli osteociti attraverso delle *gap junction*, grazie alle quali avvengono gli scambi di molecole segnale, per la coordinazione dell'attività metabolica e di deposizione della matrice ossea (2, 13, 14).

La mineralizzazione è regolata da due molecole prodotte dagli osteoblasti, ovvero l'osteonectina e l'osteocalcina. La deposizione di matrice ossea e la sua mineralizzazione avvengono in una precisa direzione: inizialmente, l'osteoblasto depone osso dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente, successivamente ne depone da ogni lato tutto intorno a sé, di modo che ciascuna cellula si allontani progressivamente dalle circostanti a causa dell'interposizione di sostanza intercellulare. A questo punto, l'osteoblasto rallenta la sua attività metabolica e si trasforma in osteocita. Terminato il processo di formazione ossea, le cellule osteoblastiche, rimaste a ridosso della superficie ossea, si trasformano in cellule progenitrici (2).

Gli osteoblasti, inoltre, producono GF e sono coinvolti attivamente nel processo di rimodellamento osseo difatti, essi sono in grado sia di attivare gli osteoclasti, mediante il rilascio di fattori solubili, sia di agire direttamente sul riassorbimento osseo, attraverso la secrezione di enzimi proteolitici tra i quali ricordiamo la collagenasi osteoblastica (2, 9).

Gli osteociti sono invece cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento e anche capaci di avviarne il rimaneggiamento. Sono cellule terminali, con un'autonomia di vita finita, finemente regolata da meccanismi endocrini (2, 12).

Morfologicamente, l'osteocita è una cellula dotata di un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e di numerosi prolungamenti citoplasmatici. Il corpo dell'osteocita rimane racchiuso in una nicchia, scavata nella sostanza intercellulare ossea, detta lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula mentre i prolungamenti sono accolti all'interno di sottili canali definiti canalicoli ossei. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti e la matrice mineralizzata, rimane uno spazio sottile, occupato da tessuto osteoide che non mineralizza. Attraverso il tessuto osteoide dei canalicoli ossei, che sono ampiamente comunicanti, l'acqua e le sostanze disciolte (gas respiratori e metaboliti) riescono a raggiungere tutti gli osteociti, anche quelli più distanti dai vasi sanguigni. Quando l'osteocita giunge al termine del suo ciclo vitale, esso ritrae i propri prolungamenti e muore per apoptosi (1, 2, 12, 13, 16, 23).

Gli osteoclasti sono le cellule preposte al riassorbimento osseo. Non sono cellule autoctone del tessuto osseo in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici.

I precursori degli osteoclasti, detti preosteoclasti, originano dal midollo osseo ematopoietico dalla linea differenziativa dei monociti.

I preosteoclasti vengono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi dei processi di riassorbimento osseo; qui giunti, migrano nel tessuto osseo e si fondono, dando vita agli osteoclasti attivi (2, 13, 16).

Gli osteoclasti sono elementi sinciziali plurinucleati, delle dimensioni di 100-200 μm , capaci di dissolvere la componente minerale e di digerire enzimaticamente le componenti organiche del tessuto osseo.

Durante la fase di riassorbimento, l'osteoclasta aderisce alla matrice mineralizzata ed è accolto in una cavità, detta lacuna di Howship, che si forma in seguito all'azione erosiva (16).

Il riassorbimento della matrice ossea inizia con la dissoluzione della componente minerale, dovuta alla acidificazione del microambiente prospiciente la zona dell'orletto increspato; nel contempo, enzimi proteolitici, liberati dall'osteoclasta, si attivano e digeriscono i componenti organici della matrice ossea.

Gli osteoclasti sono le uniche cellule dell'osso che possiedono i recettori dell'ormone calcitonina; per contro, non esprimono il recettore per il paratormone, la cui azione osteolitica sembra esplicarsi tramite gli osteoblasti che liberano fattori solubili, detti *Osteoclast Activating Factors* (OAF) che agiscono sugli osteoclasti attivandoli e promuovendo così il riassorbimento osseo (2, 9).

Anche le cellule endoteliali sono coinvolte nelle funzioni delle cellule ossee. Si è visto che, *in vitro*, le cellule endoteliali ossee producono fattori solubili, quali gli IGF (*Insuline-like Growth Factor*), che promuovono la crescita delle cellule osteoprogenitrici e il loro differenziamento in osteoblasti.

Le cellule endoteliali rilasciano, inoltre, fattori chemiotattici per i precursori circolanti degli osteoclasti, tra cui gli stessi IGF, ed esprimono molecole di adesione che consentono ai precursori osteoclastici di arrestarsi e di migrare nel tessuto osseo, ove sia richiesta la loro presenza (9).

Vari tipi di leucociti e di cellule da essi derivate, tra cui i macrofagi e i linfociti T, producono fattori in grado di influenzare le cellule dell'osso, tra questi si annoverano: l'interleuchina 1 (IL-1) e l'interleuchina-6 (IL-6) che attivano gli osteoclasti, probabilmente non in via diretta ma per tramite degli osteoblasti; l'interleuchina-3 (IL-3), che promuove la differenziazione dei preosteoclasti in osteoclasti maturi. Il *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) e le prostaglandine (PG), sono anch'essi ritenuti induttori del riassorbimento osseo (9).

È stato dimostrato che nella matrice ossea mineralizzata rimangono incarcerati numerosi GF prodotti dalle cellule ossee o di provenienza plasmatica, tra cui il TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) e gli IGF osteoblastici, il *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) e l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), il *Fibroblast Growth Factor* (FGF).

Questi fattori si liberano quando gli osteoclasti riassorbono la matrice ossea e agiscono al livello locale sulle cellule dell'osso, promuovendo attività biologiche diverse quali ad esempio, proliferazione e differenziamento degli osteoblasti e angiogenesi (2, 9, 13, 16).

1.6. Architettura: tessuto osseo non lamellare e lamellare

Lo scheletro embrionale e fetale dei mammiferi, nonché il tessuto osseo che compare inizialmente nella riparazione delle fratture, pur essendo costituito dagli stessi elementi di quello dei mammiferi adulti, differisce notevolmente da quest'ultimo per l'organizzazione delle fibre collagene, raccolte in grossi fasci intrecciati. Gli osteociti occupano lacune scavate tra gli interstizi presenti tra le fibre senza un ordine preciso. L'osso non lamellare (o intrecciato) è deposto sotto forma di lamine mal definite, con fibre variamente orientate, intorno ad un canale centrale, attraversato da un vaso sanguigno, detto canale di Havers. L'osso intrecciato è, dunque, il primo tipo di osso deposto: esso viene rapidamente riassorbito e sostituito con il tessuto osseo lamellare.

Tracce di osso intrecciato rimangono nell'adulto in alcune aree quali le suture craniche, il labirinto osseo, l'alveolo dentario e le regioni d'inserzione dei tendini.

Il tessuto osseo maturo viene definito, invece, lamellare o a fibre parallele.

Da un punto di vista macroscopico, l'osso lamellare può essere distinto in una componente spugnosa e una compatta (2, 12, 13). L'osso spugnoso ha un aspetto alveolare ed è costituito da sottili trabecole o spicole, formato da lamelle addensate che si ramificano e si anastomizzano in una rete tridimensionale, nelle cui maglie è accolto il midollo osseo. L'osso spugnoso si ritrova, per lo più, a livello delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe (12, 17, 18). L'osso compatto ha, invece, all'esame macroscopico, l'aspetto di una solida massa eburnea (12).

Con poche eccezioni, le forme compatta e spugnosa sono presenti in tutte le ossa, ma con una distribuzione e dei rapporti reciproci considerevolmente variabili (2, 12, 13).

L'osso maturo è organizzato in lamelle dello spessore di circa 3-7 μm , costituite da cellule e da sostanza intercellulare, aggregate in strati paralleli e disposte in vario modo; a seconda della loro organizzazione, si identificano il tessuto lamellare semplice e il tessuto lamellare osteonico, caratterizzato da un numero variabile di lamelle (8-20), disposte concentricamente attorno ai canali di Havers a formare l'osteon, l'unità fondamentale del tessuto osseo lamellare osteonico.

Gli osteoni appaiono come lunghe strutture cilindriche, il cui asse longitudinale tende a disporsi parallelamente alle linee di forza applicate al segmento osseo in esame (2, 12, 13, 16). Tali strutture costituiscono unità funzionali e trofiche pressoché autonome, poiché traggono nutrimento per le loro cellule dal vaso sanguigno che percorre il canale. Sono, tuttavia, presenti anastomosi vascolari tra i vasi sanguigni degli osteoni contigui, detti canali di Volkmann (2, 12, 13, 16).

Il tessuto osseo è metabolicamente molto attivo, in esso coesistono continui processi di riassorbimento e deposizione ossea, mirati a garantire la resistenza della struttura ossea ai carichi e alle sollecitazioni cui è sottoposta. Inoltre, ciò contribuisce a regolare l'omeostasi del calcio, essendo il tessuto osseo la principale riserva di calcio nell'organismo, in equilibrio continuo con il calcio ione libero nel plasma (9,16).

Le modificazioni morfofunzionali dell'osso vengono indicate con il termine di rimaneggiamento osseo, inteso come risultato di fenomeni di riassorbimento e deposizione di osso rilevabili microscopicamente e che non comportano cambiamenti macroscopici della forma del segmento coinvolto.

Il rimaneggiamento osseo inizia con il reclutamento di preosteoclasti che vengono richiamati dal torrente circolatorio e vengono indotti a differenziarsi in osteoclasti, nelle sedi dove deve avvenire il riassorbimento osseo. Gli osteoclasti attivati disgregano la matrice ossea, aprendovi lunghe gallerie cilindriche dette cavità di riassorbimento. Questi eventi richiedono la presenza e la partecipazione attiva degli osteoblasti e delle cellule endoteliali ossee. A loro volta, nuovi osteoblasti si differenziano dalle cellule osteoprogenitrici o dalle cellule di rivestimento quiescenti, aderiscono alle pareti della cavità di riassorbimento e depongono strati successivi di osso che formeranno le lamelle concentriche di un nuovo osteone. I residui delle precedenti generazioni di osteoni non completamente riassorbiti costituiscono la breccia ossea.

Nell'uomo, già dal primo anno di vita, viene deposto soltanto osso lamellare che rimpiazza rapidamente i residui di osso fibroso deposto durante la vita intrauterina (2, 9).

1.7. Istogenesi dell'osso

L'osso si sviluppa sempre per sostituzione di un preesistente tessuto, sia esso mesenchima oppure un connettivo differenziato, grazie al processo di ossificazione od osteogenesi (12).

Questo fenomeno conosce la sua massima manifestazione durante la vita prenatale ed è considerevole per tutto il periodo dello sviluppo somatico.

L'ossificazione si distingue in diretta o membranosa, indiretta o condrale e mantellare.

L'ossificazione membranosa è tipica delle ossa piatte della volta cranica e di ossa del massiccio facciale quali certe porzioni delle ossa mascellari e zigomatiche. Si caratterizza per la diretta secrezione di matrice ossea all'interno dei tessuti connettivali, senza alcuna formazione intermedia di cartilagine: inizia da centri di ossificazione, che si sviluppano nel mesenchima, in fasi precoci della vita fetale, oppure in membrane di tessuto connettivo fibroso denso, evolute dal mesenchima in fasi più tardive della vita intrauterina e nella vita postnatale.

I residui delle membrane connettivali, in cui sono sviluppati i centri di ossificazione, permangono tra le ossa piatte della volta cranica, durante la vita infantile, costituendo le fontanelle e le suture, la cui presenza consente l'accrescimento del cranio.

Una variante dell'ossificazione diretta è l'ossificazione mantellare che avviene a livello del corpo della mandibola. La peculiarità risiede nel fatto che l'osso in formazione si modella attorno ad un abbozzo cartilagineo conformato a ferro di cavallo, detto cartilagine di Meckel, derivante dal mesenchima del primo arco branchiale. Si ritiene che la cartilagine di Meckel svolga un'azione d'induzione al differenziamento in senso osseo del mesenchima circostante e che successivamente, involva; il vuoto che rimane viene colmato da tessuto osseo. Solo nella regione del mento un piccolo tratto della cartilagine di Meckel viene inglobato nella mandibola e ossifica con meccanismo condrale.

L'ossificazione indiretta o condrale è la variante più diffusa, poiché interessa tutte le restanti ossa dello scheletro assile, degli arti e della base del cranio. Tipicamente un abbozzo cartilagineo viene riassorbito e rimpiazzato da tessuto osseo. Con questo processo di osteogenesi si formano le cosiddette ossa di sostituzione (2, 12).

1.8. Guarigione ossea

La guarigione è un processo complesso e dinamico che si conclude con il ripristino della continuità anatomica e funzionale. Essa ricapitola il processo di sviluppo embrionario dell'osso, passando attraverso fasi di modellamento e di rimodellamento (9).

Le tipologie di guarigione che seguono ad una frattura e/o all'estrazione di un dente presentano due diversi meccanismi riparativi.

Dopo una frattura si forma un coagulo di sangue che, invaso da fibroblasti, macrofagi e capillari, viene sostituito da tessuto di granulazione.

Il tessuto di granulazione si trasforma in connettivo compatto e in questo si organizza una struttura cartilaginea; questi due tessuti costituiscono il callo fibrocartilagineo che riempie le fessure tra i monconi scheletrici, collegandoli temporaneamente. Nel frattempo, le cellule quiescenti del periostio si ingrandiscono e si attivano, diventando osteoblasti che depositano strati di osso membranoso all'esterno dell'osso fratturato e attorno al callo fibrocartilagineo. Successivamente zaffi osteogenici invadono il tessuto fibrocartilagineo sostituendolo con osso spugnoso di tipo encondrale. Il nuovo tessuto prende il nome di callo osseo. Durante il processo di sostituzione, i condrociti divengono ipertrofici, la matrice si calcifica ed è riassorbita, come nell'ossificazione encondrale. L'osso neoformato, inizialmente spugnoso, è progressivamente sostituito da osso compatto e occupa un volume inferiore rispetto al callo iniziale (2, 10, 19).

Dopo l'estrazione di un dente, occorre la formazione di un coagulo, costituito da cellule ematiche, siero e saliva. I vasi sanguigni vengono chiusi dai trombi e si forma una rete di fibrina, che, già nelle prime ventiquattr'ore, costituisce l'impalcatura sulla quale cominciano a migrare granulociti neutrofili, monociti e fibroblasti. Nell'area centrale inizia, ad opera di linfociti e leucociti, il processo di emolisi, attraverso il quale il coagulo viene lentamente rimpiazzato dal tessuto di granulazione. Entro due o tre giorni dall'estrazione si osserva la formazione di tessuto di

granulazione periferico, caratterizzato da piccoli vasi sanguigni, fibre collagene, fibroblasti e leucociti. Dopo quattro giorni si nota nel coagulo un'aumentata densità di fibroblasti e la proliferazione di epitelio dai margini della ferita. Ad una settimana dall'estrazione l'alveolo è caratterizzato da tessuto di granulazione costituito da vasi sanguigni, fibroblasti e nuove fibre collagene. Tre settimane dopo l'estrazione si ritrova un tessuto connettivo denso e comincia a delinearsi l'architettura trabecolare. La formazione di osso si completa in due/quattro mesi (10, 13).

La riparazione, così come il modellamento e il rimodellamento, è regolata da diversi fattori ormonali sistemici, metabolici e locali che esercitano il loro effetto su osteoclasti e osteoblasti, provocando replicazione e differenziazione cellulare, chemiotassi e diversificazione funzionale (2, 9).

Tra i fattori di natura endocrina e metabolica, annoveriamo il paratormone, l'ormone della crescita, la calcitonina, gli ormoni tiroidei, gli ormoni sessuali, la vitamina D, la vitamina C, la vitamina A, l'ossigeno e il monossido d'azoto.

I principali fattori locali sintetizzati dalle cellule scheletriche includono i GF, le citochine e le prostaglandine.

I GF sono polipeptidi che regolano la replicazione, la differenziazione, l'attività e la morte cellulare. Il tessuto osseo è una ricca fonte di GF in grado di regolarne la formazione e il riassorbimento. Tali fattori esercitano il proprio effetto su cellule della stessa classe (fattori autocrini) o su cellule di classe diversa, nell'ambito dello stesso tessuto (fattori paracrini). I GF sono, inoltre, presenti nella circolazione sanguigna e possono agire come regolatori sistemici del metabolismo scheletrico. La loro attività locale risulta modulata da cambiamenti nella loro sintesi e concentrazione, attivazione, relazione con recettori e proteine (9).

Nella riparazione del tessuto osseo, le piastrine rilasciano numerosi mediatori chimici tra cui il TGF- β che, durante l'iniziale fase infiammatoria del processo di guarigione, dà inizio alla formazione del callo osseo. In questo modo, alla fase di formazione dell'ematoma, come immediata risposta alla lesione, può seguire una fase di formazione intramembranosa e/o un'ossificazione di tipo encondrale, con ricostituzione dell'integrità del tessuto.

I GF esercitano i loro effetti legandosi ai recettori presenti sulla superficie cellulare. Si tratta di famiglie di polipeptidi che si legano selettivamente al proprio substrato, con un'affinità variabile. I recettori per i GF sono principalmente chinasi transmembranose, che agiscono come segnali, attraverso la formazione di complessi eteromerici, che comunicano con il nucleo e regolano l'espressione di proteine determinanti per la funzione cellulare. I recettori per IGF, PDGF, FGF, EGF, e altri GF appartengono al gruppo delle tirosinchinasi. La superfamiglia TGF- β , incluse le BMP, si lega invece a serin/treonin chinasi. Tutti i GF sono regolati da un meccanismo di *feed-back*, nel senso che la quantità di fattore rilasciata influenza la produzione dello stesso in maniera positiva o negativa, a seconda delle necessità biologiche. L'azione dei vari GF non rimane isolata e indipendente, ma deve venire intesa come un'interazione sinergica di più componenti con effetti diversi e a volte contrastanti. Durante lo sviluppo, la concentrazione e la diversificata espressione dei GF determina la varietà e la molteplicità delle loro azioni. I GF hanno dimostrato di svolgere attività pleiotrofiche nella riparazione tissutale di pressoché tutti i tessuti, compreso il parodonto. I principali mediatori chimici implicati nella guarigione ossea sono rappresentati dagli IGF, dalla superfamiglia TGF- β , dagli FGF, dai PDGF, ma non bisogna dimenticare il ruolo di altri GF e citochine coinvolti, anche se in maniera minore, nel metabolismo osseo (9, 16, 20, 21).

2. RIGENERAZIONE OSSEA E BIOMATERIALI

2.1. Generalità

La precoce perdita degli elementi dentali, la malattia parodontale e gli esiti di traumi maxillo-facciali possono determinare quadri variabili di atrofia ossea, condizione che non si coniuga in modo favorevole con un'eventuale terapia di riabilitazione implanto-protetica. L'atrofia verticale e/o orizzontale si associa talora alla pneumatizzazione dei seni mascellari, con conseguente ulteriore riduzione del tessuto osseo a disposizione per il posizionamento di impianti osteointegrati.

Il ripristino della funzione masticatoria in pazienti parzialmente o totalmente edentuli necessita della presenza di un volume osseo tale da permettere un risultato funzionale ed estetico ottimale e molteplici sono le tecniche ricostruttive fruibili (2). Si distinguono:

- tecniche chirurgiche di tipo additivo esterno quali gli innesti *onlay* di osso autologo orizzontali e verticali e la rigenerazione ossea guidata (*Guided Bone Regeneration*, GBR) (2, 11, 22);
- tecniche chirurgiche di tipo additivo interno quali il rialzo della mucosa del seno mascellare e del pavimento nasale (5, 23-27);
- tecniche chirurgiche di tipo espansivo quali l'espansione crestale o *split crest* (2, 11);
- tecniche chirurgiche osteotomiche quali la distrazione ossea con effetto osteogenico (2);
- tecniche non chirurgiche quali la trazione ortodontica (16).

L'esecuzione della maggior parte delle metodiche chirurgiche citate viene supportata dall'utilizzo di biomateriali da innesto dotati di diversa origine e caratterizzati da differente influenza sul tessuto osseo, spesso in associazione con membrane-barriera che, proteggendo e isolando il coagulo ematico, rendono possibile la creazione di un ambiente favorevole alla rigenerazione (2, 13, 16). La membrana, per svolgere il suo ruolo, deve avere delle caratteristiche di:

- biocompatibilità;
- permeabilità selettiva (deve consentire il passaggio di nutrienti ma non di cellule);
- stabilità;
- maneggevolezza.

Nella pratica clinica si utilizzano sia membrane non riassorbibili che riassorbibili.

Le membrane non riassorbibili, costituite da e-PTFE, un materiale inerte e biocompatibile che non subisce nel tempo l'idrolisi da parte dell'organismo, sono quelle più utilizzate e con il più ampio numero di studi di follow-up disponibili. Queste membrane presentano una superficie interna che impedisce il passaggio cellulare e fornisce la rigidità richiesta e una superficie esterna più porosa che consente la crescita del tessuto sovrastante. Attualmente, vengono prodotte anche membrane dotate di una struttura interna in titanio che garantisce l'effetto tenda (5, 22, 28).

Il principale svantaggio della non riassorbibilità sta nella necessità di un secondo intervento chirurgico per la rimozione della membrana.

Le membrane riassorbibili vengono degradate dall'organismo ed evitano, per questo, il rientro chirurgico. La loro eventuale precoce esposizione comporta delle complicanze di modesta entità. Gli svantaggi più importanti risiedono invece nella scarsa predicibilità del tempo di riassorbimento e nella tendenza al collasso. Possono essere composte da dura madre, poliuretano, acido poliglicolico, acido polilattico, pericardio e collagene. Queste ultime sono ottenute dal derma o dai tendini di origine bovina, equina e suina e presentano un tempo di riassorbimento pari a 4-8 settimane; il collagene di cui sono costituite sembra svolgere un ruolo attivo nella

formazione del coagulo e avere azione chemiotattica nei confronti dei fibroblasti gengivali e parodontali; tuttavia inducono una risposta antigenica nell'ospite (2, 11, 16, 22).

Una valida alternativa a membrane di origine biologica è data da quelle a base di polimeri sintetici come l'acido poliglicolico e polilattico che presentano lo stesso tempo di riassorbimento e che sono privi di componenti allogenici e xenogenici, responsabili della risposta antigenica (13, 16, 29, 30).

2.2. Biomateriali

La correzione di quadri di variabile atrofia ossea si prefigge il recupero di un corretto volume del tessuto nonché il ripristino della funzionalità dello stesso infatti, l'obiettivo auspicabile è quello di ottenere una ricostruzione composta da solo tessuto osseo endogeno del paziente, in grado di rimodellarsi in modo fisiologico in risposta alle forze esercitate (2, 9, 11). Ne deriva che un biomateriale da innesto ideale dovrebbe possedere delle caratteristiche di riassorbibilità e rimodellamento (con un *turnover* paragonabile a quello del tessuto osseo), associate alle capacità di indurre accelerazione dei fisiologici processi di guarigione, attraverso meccanismi sia di tipo osteoconduttivo che osteoinduttivo (2, 9, 11).

I biomateriali possono essere classificati, in base alla loro origine e provenienza, in biologici come gli innesti ossei autologhi, omologhi, eterologhi, l'idrossiapatite filogenica e i coralli, e in alloplastici o di sintesi.

Gli innesti d'osso autologo rappresentano il trattamento d'elezione nella ricostruzione tridimensionale del massiccio facciale con grave atrofia ossea. L'osso autologo, infatti, presenta tutte le caratteristiche di un biomateriale ideale:

- biocompatibilità, senza antigenicità;
- osteoinduzione, osteoconduttività, osteogenesi;
- facile reperibilità;
- facoltà di essere eliminato e sostituito con osso neoformato;
- facile manipolazione;
- qualità strutturali ottimali;
- basso rischio infettivo;
- alta affidabilità;
- buon rapporto costi/benefici (2, 4, 10).

L'osso utilizzato per questo tipo di innesti, può essere prelevato sia da sedi intraorali (sinfisi mentoniera, ramo mandibolare, area retromolare, tuberosità mascellare, spina nasale anteriore, cresta alveolare) sia da sedi extraorali (cresta iliaca, calvaria, tibia, ulna). Gli innesti ossei, quindi, possono essere distinti in base alle caratteristiche morfologiche in innesti ossei corticali, spongiosi, cortico-spongiosi, e particolati o bone chips (2, 8, 13, 16, 31).

Il processo rigenerativo che segue l'inserimento di osso autologo, consta di tre fasi: una iniziale, una osteoconduttiva e, infine, una ossea lamellare (10, 11, 32).

Nel processo rigenerativo iniziale le piastrine contenute nel coagulo vanno incontro a degranolazione liberando i GF che, attraverso la rigenerazione capillare e la stimolazione delle mitosi, determinano l'incremento del numero delle cellule staminali. Queste ultime iniziano la deposizione di sostanza osteoide che va progressivamente aumentando a seguito della rivascolarizzazione.

Nella fase osteoconduttiva o dell'osso immaturo avviene il consolidamento dell'innesto attraverso la confluenza delle isole osteoidi, grazie alla presenza del reticolo di fibrina dell'innesto. Al termine di questa seconda fase, che dura dalla terza alla sesta settimana, si assiste

alla deposizione e mineralizzazione di una quantità di matrice osteoide sufficiente da permettere l'integrazione dell'innesto (10, 11, 13, 32).

Nella terza fase il tessuto immaturo viene completamente riassorbito, rimodellato e sostituito con osso lamellare, grazie all'azione degli osteoclasti giunti nel sito attraverso la rete di capillari neoformati. Entro il quarto mese si ha la formazione di un nuovo endostio e periostio maturo e funzionale. Trascorsi sei mesi dal suo innesto l'osso autologo presenta ampie cavità osteocitarie e si rende distinguibile una componente midollare e, nelle fasi successive, una corticale. Grazie ai processi di rimaneggiamento la porzione midollare, al contrario di quella corticale, rivascolarizzandosi più velocemente va incontro dapprima ad un processo di apposizione ossea e poi ad uno di riassorbimento fino ad una completa guarigione. Solo dopo alcuni anni l'innesto mostrerà radiograficamente la morfologia e i profili corticali propri della mandibola e del mascellare (10, 11, 13, 32).

L'osso omologo, prelevato da vivente o da cadavere (entro le prime 24 ore dal decesso) presenta una struttura fisica identica a quella del ricevente ed ha quindi delle ottime qualità osteoconduttive. Per evitare lo scatenarsi della risposta immunitaria viene sottoposto a processi di liofilizzazione (*Freeze-Dried Bone*, FDB) e di liofilizzazione e demineralizzazione (*Demineralized Freeze-Dried Bone*, DFDB). Il tessuto prelevato viene macinato, delipidato con etanolo, disidratato e congelato. Successivamente, le particelle vengono ulteriormente triturate raggiungendo dimensioni medie di 250-750 μm . Per ottenere DFDB, inoltre, l'osso omologo viene immerso per 6-16 ore in acido citrico.

I trattamenti cui il tessuto osseo viene sottoposto riducono l'antigenicità ma esistono dei rischi, seppur remoti, di trasmissione virale (2, 9, 11, 13, 16).

L'FDB agisce prevalentemente da struttura osteoconduttiva, mentre DFDB avrebbe anche un'azione osteoinduttiva, grazie alla liberazione di BMP, resa possibile dalla demineralizzazione. Questa caratteristica è, tuttavia, fortemente influenzata dall'età del cadavere (più è giovane più sono presenti BMP), dalla grandezza delle particelle (i risultati migliori sembrano sortire dall'utilizzo di particelle di grandezza compresa tra 200 e 1000 μm) e dalla sede del prelievo (l'osso membranoso possiede maggiore concentrazione di BMP).

Studi istologici hanno dimostrato che questo biomateriale è scarsamente riassorbibile (2, 9, 11, 13, 16).

Attualmente i dubbi che sussistono circa le capacità induttive, i tempi di riassorbimento, sulle qualità biomeccaniche dell'osso rigenerato e la possibilità infettiva, non consentono a questo materiale di essere considerato un indicato sostituto osseo.

Il tessuto osseo eterologo è per lo più di origine suina, bovina ed equina. Anche questo biomateriale offre i migliori risultati se utilizzato nella forma spongiosa.

La più lunga esperienza sperimentale e clinica si è ottenuta con i biomateriali di origine bovina: questi mostrano un'affidabile attività di osteoconduzione e lunghi tempi di rimodellamento e riassorbimento.

Questo tipo di osso, deproteinizzato, deantigenato e sterilizzato, viene fornito sia in blocchi sia in granuli di spongiosa o corticale. È costituito da apatite bovina che presenta micro e macropori favorevoli alla stabilità del coagulo e la neogenesi ossea. Questo biomateriale si presta ad essere miscelato con osso autologo e si integra bene nel sito ricevente, dove stabilisce dei contatti diretti.

Recentemente sono state introdotte delle apatiti bovine con doppia morfologia delle porosità, ottenuta sintetizzando polvere di calcio fosfato in granuli da 250 a 600 μm con grande porosità bimodale da 10 a 60 μm , in cui i pori grandi comunicano tra di loro tramite i fori di piccole dimensioni. Questa struttura sembrerebbe favorire la formazione di matrice organica all'interno delle porosità e conferire al materiale anche un'attività osteoinduttiva (2, 9, 11, 15, 16, 33-37).

I biomateriali di origine equina subiscono processi di deantigenazione enzimatica e assomigliano all'idrossiapatite naturale, presentando un riassorbimento compatibile con il turnover dell'osso umano di circa 12 mesi (2, 9, 11, 38, 39).

I biomateriali di origine suina vengono deantigenati e presentano un riassorbimento medio di 12-24 mesi (2).

I coralli sono dei materiali con azione osteoconduttiva che derivano dalle alghe marine calcificate e sono costituiti prevalentemente da carbonato di calcio in fase cristallina. Presentano una struttura tridimensionale simile all'osso e sono dotati di porosità superiore al 45%, con pori di circa 150 µm. Sono sotto forma di granuli o blocchi e vengono riassorbiti in circa 24 mesi, periodo durante il quale l'osso si sviluppa intorno e all'interno dei granuli (2, 9, 13, 16).

Le idrossiapatiti filogeniche sono dei materiali biocompatibili derivanti anch'essi dalle alghe marine calcificate. La presenza di canali e di pori di 1 µm rende questi biomateriali osteoconduttivi e osteoinduttivi (2). Le superfici di contatto vengono, infatti, notevolmente aumentate dalla penetrazione di fluidi e di cellule, resa possibile proprio dall'orientamento dei canali. Il riassorbimento si esplica in un tempo molto lungo di circa 3 anni (2, 9, 11, 16).

I sostituti ossei di sintesi comprendono i biovetri, i polimeri dell'acido poliglicolico e polilattico, l'idrossiapatite sintetica, il solfato e il fosfato di calcio (40), i quali sono considerati biomateriali dotati di proprietà di tipo osteoconduttivo.

I biovetri sono dei materiali di natura vetrosa contenenti prevalentemente silice, ossido di sodio, ossido di calcio e in minor misura pentossido di fosforo. Presentano una bioattività legata ad un processo di degradazione idrolitica superficiale del fosfo-silicato vetroso. Nell'interfaccia tessuto osseo-vetro, per interazione con il plasma sanguigno, si verifica il rilascio di ioni calcio, fosforo e silicio e la formazione di uno strato di silice ad elevato contenuto di ioni idrossilici. In questo sito avviene un progressivo accumulo di fosfato di calcio amorfo che, infine, si trasforma in idrossiapatite. Le cellule osteogeniche riconoscono come proprio questo stato e vi si legano stabilmente. I biovetri presentano delle particelle granulari di circa 300 µm tra le quali è presente uno spazio che favorisce l'infiltrazione e la deposizione di osso oltre gli ioni calcio e fosfato che il materiale rilascia passando attraverso i fluidi organici e vengono riutilizzati nella formazione di nuovo tessuto osseo. Il processo di riassorbimento inizia dopo 2 fino a 16 settimane dall'innesto e si completa in tempi molto lunghi, anche dopo 16 mesi (2, 9, 16, 41,42).

I polimeri dell'acido poliglicolico e polilattico sono prodotti di sintesi altamente biocompatibili: non inducono reazioni immunologiche o infiammatorie, sono dotati di capacità osteoconduttive e sono completamente sostituiti da osso trabecolare. Questi biomateriali sono forniti sotto forma di blocchi, granuli o gel e quest'ultima formulazione viene spesso utilizzata con altri biomateriali eterologhi, in un rapporto 50:50, poiché è in grado di aumentarne l'adesività. Il processo di riassorbimento, assai rapido, avviene in circa 60-90 giorni (11, 13, 16).

L'idrossiapatite sintetica è uno dei biomateriali da più lungo tempo in commercio. Rappresenta la componente inorganica dell'osso umano e ha ottime proprietà osteoconduttive (14). L'idrossiapatite viene fornita in microgranuli del diametro di 200-500 µm o in blocchi. La porosità varia dal 70 al 90% con pori che sono connessi tra loro da spazi da 80 a 200 µm, questa geometria favorisce enormemente la neogenesi ossea e, negli ultimi anni, diversi studi hanno indagato sulla favorevole interazione tra questo biomateriale, BMP e osso autologo. Il periodo necessario al riassorbimento dell'idrossiapatite sintetica può essere anche di 4 anni e sulla velocità del processo sembrano avere grande influenza le dimensioni dei pori e dei granuli (2, 9, 43-45).

Il solfato di calcio è un biomateriale già largamente utilizzato in ortopedia a partire dal 1900 ha una formulazione assai simile all'idrossiapatite ma, rispetto ad essa, presenta un maggior contenuto di calcio, una diversa densità e solubilità; inoltre, è completamente riassorbibile.

Il solfato di calcio emidrato esiste in due forme alfa e beta: quest'ultima è la più utilizzata. I granuli, che fungono da nuclei per la neogenesi ossea, hanno diametro molto variegato; raramente,

vengono prodotte e utilizzate polveri di solfato di calcio. Il processo di riassorbimento del materiale inizia intorno alla sesta settimana dall'intervento e si conclude in un tempo assai variabile, di 6-20 mesi (10, 45,46).

Accanto ai biomateriali descritti finora meritano una disamina i GF e il plasma ricco di piastrine.

Tutti i materiali appena descritti, fatta eccezione per l'osso autologo, svolgono principalmente un'attività osteoconduttiva e non sono, dunque, in grado di interagire attivamente nel sito dell'innesto con meccanismi di signalling, per modulare positivamente la rigenerazione ossea (2). Per questo motivo, negli ultimi anni, si stanno sviluppando degli interessanti filoni di ricerca, nel campo dell'ingegneria tissutale, circa la possibilità di utilizzare materiali osteoinduttivi a fini rigenerativi.

I GF rappresentano le più importanti proteine solubili con azione osteoinduttiva e la sperimentazione clinica ha concentrato la propria attenzione particolarmente sull'utilizzo di:

- BMP;
- TGF- β ;
- PDGF;
- PRP (Plasma Ricco di Piastrine).

Le BMP fanno parte della superfamiglia di GF noti come TGF- β . Sono proteine con una spiccatissima capacità di stimolazione del differenziamento delle cellule pluripotenti in ossee e cartilaginee. *In vivo*, vengono espresse nelle cellule dell'osso in fase di sviluppo, nel callo osseo formato in seguito a fratture, nell'osso ectopico, indotto dall'impianto locale di BMP (9, 46, 47). Esse risultano essenziali nel processo di osteogenesi, poiché regolano l'espressione di alcuni fattori di trascrizione, critici per la formazione di osso. Un aspetto peculiare è che alcune BMP vengono espresse anche da cellule ameloblastiche e odontoblastiche. La loro presenza sulla superficie cellulare odontoblastica, sembrerebbe indurre il differenziamento in odontoblasti di cellule pulpari (9, 20, 21, 48-50).

Perché le BPM possano indurre la formazione di nuovo osso, è necessario che vengano somministrate con un *carrier* adeguato (6, 9, 15, 34, 51-53).

La superfamiglia dei TGF- β comprende, oltre loro stessi, le activine e le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP). Si tratta di un insieme di molecole di segnalazione che vengono secrete per regolare molteplici aspetti della funzione cellulare. I TGF- β regolano la crescita e la differenziazione di numerose cellule, comprese quelle osteoblastiche. Il TGF- β presenta almeno cinque componenti dei quali sembrano svolgere un'azione rilevante sull'osso il TGF- β 1, il TGF- β 2 e il TGF- β 3. Sono, infatti, prodotti in elevata quantità dagli osteoblasti e poi incorporati nella matrice mineralizzata (9, 2). Nell'uomo, la presenza di TGF- β diminuisce con l'età e la loro produzione è stimolata da ormoni come gli estrogeni e il progesterone, ma anche il PTH (*Para-Thyroid Hormone*) e la vitamina D. Il ruolo fondamentale di questi fattori è di inibire il riassorbimento osseo, prevenendo la formazione di precursori osteoclastici, stimolando l'apoptosi degli osteoclasti maturi e diminuendo la sintesi di metalloproteinasi. *In vitro*, i TGF- β hanno dimostrato di poter controllare la replicazione degli osteoblasti sia in senso positivo che negativo, in funzione della propria concentrazione e di quella cellulare. Essi possono aumentare la produzione di collagene e fosfatasi alcalina negli osteoblasti (9).

In generale, l'azione osteoinduttiva del TGF- β è piuttosto debole, se paragonata a quella delle BMP; tuttavia, il TGF- β potenzia notevolmente l'azione di queste ultime (2, 9, 10).

Il sistema dei PDGF comprende fattori di crescita, isolati per la prima volta nelle piastrine presenti nel circolo sanguigno e sono considerati importanti nelle fasi di riparazione tissutale. In seguito sono stati identificati in molti altri sistemi cellulari. La molecola di PDGF è un dimero proteico dei geni PDGF-A e PDGF-B, cosicché i peptidi maturi esistono sotto forma di PDGF-AA e PDGF-B omodimeri e PDGF-AB eterodimeri. Esistono due diversi recettori per i PDGF:

PDGF - α e - β . PDGF è espresso dalle cellule endoteliali, dove svolge la funzione di fattore regolatore della crescita cellulare. La sintesi del PDGF è a sua volta controllata da fattori di crescita (9, 10).

I PDGF sono presenti sia a livello ematico che interstiziale e quindi interferiscono sul metabolismo cellulare sia a livello locale che sistemico. Le varie isoforme stimolano, essenzialmente, la replicazione delle cellule ossee. L'effetto mitogeno, di cui i PDGF sono responsabili, si estende anche alle cellule produttrici di collagene. Non sembrano invece promuovere direttamente la differenziazione degli osteoblasti, pur svolgendo un ruolo importante nell'aumentare il pool di cellule della linea osteoblastica che infine esprimeranno questo fenotipo. In culture i PDGF, stimolano la sintesi di DNA, la chemiotassi, la formazione di collagene e di proteine non collageniche. *In vivo* i PDGF favoriscono la sintesi del collagene e la formazione di tessuto osseo. PDGF-BB è più potente di PDGF-AA, mentre mostra un comportamento intermedio PDGF-AB. In particolare, PDGF-BB è in grado di aumentare il numero degli osteoclasti e di indurre l'espressione di MMP-13 (*Matrix MetalloPeptidase-13*), stimolando il riassorbimento osseo (9, 46, 47).

Il sistema PDGF può venire influenzato da altri fattori di crescita, ad esempio l'espressione dei geni PDGF-A e PDGF-B è regolata anche da TGF- β . Recentemente sono stati ottenuti risultati incoraggianti nell'utilizzo di questi fattori di crescita, in associazione ad innesti di osso omologo o eterologo, nel trattamento di ampi difetti ossei parodontali (9,16).

Il plasma ricco di piastrine (PRP) viene ottenuto dal sangue dell'individuo, attraverso particolari processi di centrifugazione e rappresenta, quindi, un materiale autologo estremamente valido nella rigenerazione ossea (ma anche dei tessuti molli). Le piastrine, infatti, sono un prezioso serbatoio di fattori di crescita e l'impiego del PRP, sia da solo che in aggiunta o ad osso autologo o a biomateriali di natura eterologa, sortisce degli effetti estremamente positivi: viene accelerato il processo di rigenerazione ossea, viene incrementata la densità del tessuto osseo rigenerato, vengono accelerati i processi di guarigione dei tessuti molli e vengono perfino diminuiti gli effetti collaterali legati agli interventi chirurgici, cioè il dolore e l'edema (9, 2, 10).

2.3. Scaffold e osteoconduzione

È noto, ormai, che la formazione di nuovo tessuto osseo necessita della compresenza di un segnale osteoinduttivo, presente nella matrice proteica solubile, di cellule mesenchimali che, ricevendo il segnale, differenziano in osteoblasti e di un supporto meccanico o *scaffold* (2, 9).

Il termine *scaffold* (dall'inglese: impalcatura) identifica un substrato o matrice tridimensionale in grado di offrire sostegno al processo di rigenerazione ossea: sono considerati *scaffold*, dunque, tutti i biomateriali precedentemente esaminati.

Gli *scaffold* svolgono un'azione osteoconduttiva fortemente condizionata sia dalle loro caratteristiche chimiche che determinano la possibilità di riassorbimento del materiale, sia da quelle strutturali e meccaniche da cui dipende l'interazione con il tessuto osseo (1, 3, 53-58).

Subito dopo la realizzazione di un innesto si forma un coagulo che avvolge tutto il biomateriale e dalle pareti del sito ricevente arrivano cellule endoteliali, mesenchimali e infiammatorie; in questa fase lo *scaffold* garantisce e supporta la neoformazione di osso, consentendo l'adesione e il differenziamento delle cellule mesenchimali in osteoblasti e un'appropriata invasione vascolare sulla sua superficie e al suo interno. L'osteoconduttività si identifica, dunque, nella capacità del biomateriale di dirigere la crescita ossea dalla periferia verso il proprio interno e integrarsi così con il tessuto ricevente (2, 53, 54).

Perché gli *scaffold* possano assolvere la loro funzione, è importante che essi abbiano delle proprietà specifiche, vicine il più possibile a quelle del tessuto osseo autologo (3, 6).

Ricordiamo che un biomateriale ideale dovrebbe mostrarsi biocompatibile e antigenicamente inerte, privo di rischio di trasmissione di malattie infettive e di tossicità sistemica, dotato di elevate proprietà di supporto e meccaniche, assolutamente riassorbibile, di facile manipolazione e di costo contenuto.

Si fanno sempre più numerose e proficue le indagini sperimentali, in ingegneria tissutale, dedicate allo studio dei biomateriali e, in particolare, alla loro geometria, come fattore di importanza assoluta e determinante nel contesto della rigenerazione ossea (2, 3, 9).

Gli studi cui si fa riferimento, prendono in considerazione le seguenti caratteristiche, in *scaffold* di diversa natura e ottenuti attraverso differenti procedimenti di produzione:

- porosità;
- dimensione dei pori;
- spessore delle trabecole;
- distanza media tra i margini delle trabecole (corrispondente al diametro medio dei pori);
- rapporto superficie di contatto-volume;
- interconnettività (3, 6, 55-57).

I dati ottenuti grazie alle diverse sperimentazioni, sia *in vivo* che *in vitro*, hanno messo in luce, innanzi tutto, la necessità di un'elevata porosità, poiché la possibilità di invasione dell'innesto da parte di cellule progenitrici è direttamente collegata alla presenza di pori all'interno del materiale innestato (3, 53, 58).

Maggiore è il contenuto percentuale di pori, maggiore sarà la migrazione di cellule mesenchimali e osteoblasti nel sito ricevente. Inoltre, un'elevata porosità e un elevato rapporto superficie di contatto-volume (ovvero un numero di pori elevato e di piccole dimensioni) favoriscono l'adesione cellulare (6, 14, 56).

Le indagini pubblicate concentrano la propria attenzione, quindi, sull'identificazione di un diametro minimo dei pori funzionale ai processi di osteoconduzione: a tal fine, alcuni hanno stimato sufficiente una dimensione di circa 100 μm , mentre altri studi successivi hanno dimostrato che, per migliorare l'osteogenesi, sono necessari pori aventi dimensioni maggiori di 300 μm (55, 57).

Un particolare accento viene posto, inoltre, sulla necessità di ottenere dei biomateriali non solo dotati di elevata porosità ma anche caratterizzati da elevata interconnettività, ovvero di ampia comunicazione tra i pori stessi.

Si è visto, infatti, come la copresenza in uno *scaffold* di pori di grandi dimensioni e di interconnessioni, incentivi il processo di neoformazione ossea, poiché permette un'abbondante vascolarizzazione e un adeguato trofismo non solo in periferia ma anche nella porzione più interna dell'innesto (3, 55, 57).

Uno degli obiettivi dei più importanti indirizzi di ricerca risiede, poi, nella realizzazione di un biomateriale dotato, al contempo, della struttura interna funzionale alla rigenerazione ossea e di una totale e fisiologica tendenza al riassorbimento: attualmente, tra i materiali disponibili in commercio, quelli dotati di maggiore porosità e quindi di migliori caratteristiche architettoniche e osteoconduttive (come l'idrossiapatite) si riassorbono, tuttavia, in un intervallo di tempo piuttosto lungo (3, 9).

Molte sperimentazioni, inoltre, hanno voluto analizzare il rapporto esistente tra i parametri morfometrici e le proprietà meccaniche dei materiali (55).

Sottoponendo i campioni a misurazioni del modulo di compressione e della rigidità, è stata riscontrata una riduzione di questi all'aumentare della grandezza dei pori; d'altro canto anche il numero e lo spessore delle trabecole sono stati correlati alle caratteristiche meccaniche (38, 55).

Tutto ciò mette, dunque, in evidenza la necessità di un compromesso tra le diverse proprietà strutturali degli *scaffold*; fondamentale è, infatti, l'azione di sostegno dell'innesto, che, nelle fasi

iniziali del processo di integrazione, sostituisce il segmento osseo mancante e deve essere in grado di sostenere le sollecitazioni determinate dai carichi funzionali.

La ricerca nel campo dei biomateriali e delle loro proprietà ha consentito finora di porre le basi per un più ampio panorama applicativo sia in chirurgia orale e maxillo-facciale sia in ortopedia. Le maggiori aspettative vengono oggi riposte nella possibilità di sfruttare gli *scaffold* non solo come materiali osteoconduttivi, ma anche come *carrier*, quindi come veicoli, di fattori di crescita e cellule mesenchimali, mediando, in tal modo, un'azione osteoinduttiva (6, 15, 20, 21, 34, 46-53).

3. MICROTOMOGRAFIA TRIDIMENSIONALE COMPUTERIZZATA A RAGGI X

3.1. Generalità

La microtomografia a raggi X abbreviata in microCT (*micro Computerized Thomography*) rappresenta una forma miniaturizzata della Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) convenzionale, in grado di fornire informazioni rispetto alla struttura interna di un corpo opaco, attraverso la produzione di immagini tridimensionali ad elevata risoluzione (38, 59).

L'innovazione di tale metodica risiede nella possibilità di effettuare l'analisi di un campione senza che quest'ultimo debba essere sottoposto a tagli, coperture o trattamenti chimici di sorta; tale aspetto inquadra, dunque, la microCT in un'indagine non distruttiva e ne estende notevolmente il campo applicativo (4, 38, 59).

La tomografia computerizzata utilizza le informazioni relative all'interazione dei raggi X con la materia, ottenendo immagini di tipo numerico, ricostruite da un calcolatore mediante l'uso di algoritmi matematici (4, 38, 59, 60).

Una sorgente produce un fascio di raggi X collimato e molto sottile, in modo da illuminare una sezione stretta del campione, posizionato su di un supporto mobile. La radiazione incidente, a seguito dell'interazione con la materia, subisce un'attenuazione d'intensità la cui misura viene rilevata da un detector di alta risoluzione; i dati raccolti vengono, quindi, trasmessi al calcolatore. Successivamente, l'oggetto viene ruotato a piccoli incrementi angolari per 180° e l'operazione viene ripetuta per ogni rotazione. Un programma del calcolatore rende le informazioni acquisite sotto forma di un'immagine bidimensionale (2D) dei coefficienti di assorbimento; l'immagine tridimensionale (3D) si ottiene per sovrapposizione di immagini 2D di sezioni adiacenti (4, 38, 59, 61).

L'uso di un rivelatore CCD (*Charge Coupled Device*) permette la realizzazione di immagini con risoluzione dell'ordine di grandezza del micron e limita al minimo il tempo di esame del campione (4, 38, 59).

3.2. Raggi X

Nella tecnica microtomografica, l'acquisizione dei dati relativi alla struttura dell'oggetto esaminato è resa possibile dall'interazione dei raggi X con la materia e, quindi, dall'attenuazione di questi.

I raggi X rappresentano la porzione dello spettro elettromagnetico con una lunghezza d'onda compresa approssimativamente tra 10 nanometri (nm) e 1/1000 di nanometro (61). Raggi X con una lunghezza d'onda superiore a 0,1 nm sono chiamati raggi X molli. A lunghezze minori, sono chiamati raggi X duri. I raggi X presentano delle caratteristiche per le quali possono essere accomunati alle onde acustiche; infatti, la loro velocità di propagazione è descritta dalla seguente relazione:

$$v = \lambda \nu$$

dove v è la velocità, λ è la lunghezza d'onda e ν è la frequenza; non necessitano di un mezzo di propagazione e, se questo è presente e omogeneo, diffondono secondo una linea retta; la loro intensità diminuisce inversamente al quadrato della distanza dalla sorgente puntiforme;

producono fenomeni di interferenza e diffrazione; non vengono deflessi dai campi magnetici (38, 61).

La produzione di questo tipo di radiazione è resa possibile dall'utilizzo di un tubo radiogeno o tubo a raggi X convenzionale, costituito da un'ampolla di vetro sotto vuoto spinto, che contiene un catodo e un anodo ad alta tensione. Il tubo radiogeno è contenuto a sua volta in una guaina metallica (generalmente di alluminio, con schermature di piombo) riempita di olio dielettrico: l'olio consente sia di dissipare il calore generato dal tubo in funzione, che di garantire l'isolamento elettrico. Scopo della guaina è sia di protezione meccanica, sia di assorbire alcune delle lunghezze d'onda dei raggi X prodotti che non sono utili agli scopi preposti. Il filamento riscalda il catodo, che inizia ad emettere elettroni per effetto termoionico; la nube elettronica intorno ad esso viene accelerata dall'alta tensione, che proietta gli elettroni verso l'anodo dove colpiscono il disco metallico: nell'impatto l'energia cinetica che avevano acquisito si trasforma in calore (per il 99%) e in radiazione X (per l'1%). I tubi radiogeni emettono una radiazione policromatica costituita, quindi, da diverse lunghezze d'onda (7 38).

La radiazione utilizzata dalla microCT viene resa monocromatica, invece, attraverso un procedimento di filtrazione da parte di un filtro passa-banda, in modo da ottenere un'attenuazione del problema dell'indurimento del fascio e migliorarne la sensibilità alle più piccole variazioni di assorbimento all'interno del campione (risoluzione di contrasto). Il fascio di raggi può essere sintonizzato a diversi valori energetici, permettendo che l'assorbimento ottimale sia scelto, per ogni campione, secondo il formato e/o la composizione; inoltre, prima dell'interazione, il fascio deve essere opportunamente collimato, per consentire una scansione uniforme della sezione e la presenza del maggior numero di fotoni incidenti per unità di superficie (4, 38, 59, 61, 62).

3.3. Skyscan 1072

Una strumentazione attraverso la quale la tecnica microtomografica trova un'applicazione pratica è il sistema denominato Skyscan 1072.

Questo strumento consente sia di effettuare scansioni di campioni di ridotte dimensioni riproducendone immagini tridimensionali sia di acquisire informazioni di carattere morfometrico (59).

La macchina Skyscan 1072 presenta un generatore di raggi X, un portacampione rotante e una camera CCD, coordinati da un computer, dotato di un software dedicato e sofisticato per la ricostruzione tridimensionale delle immagini e per i relativi parametri morfometrici (38, 62).

Alla base del funzionamento del macchinario, vi è l'applicazione di una geometria parallela o cone-beam la quale utilizza un fascio di raggi a forma di cono. La registrazione dell'attenuazione dei raggi è effettuata da un rilevatore bidimensionale. La sorgente è di tipo puntiforme e produce un fascio di raggi a ventaglio; la selezione di una parte di questi raggi consente di ottenere dei fasci pseudo-paralleli (4, 38, 59, 61).

Grazie all'applicazione della geometria cone-beam, l'oggetto esaminato risulta ingrandito, in corrispondenza del rilevatore; l'ingrandimento viene regolato e modificato, attraverso la variazione della distanza tra la sorgente dei raggi X e il rilevatore.

In funzione dell'ingrandimento scelto, il campo di vista può cambiare da 20 mm a 2 mm con un range di risoluzione spaziale da circa 20 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ a 5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, rispettivamente (4, 38, 59, 61, 62).

Il rilevatore, su cui l'ingrandimento si verifica, è costruito con una tecnologia CCD ed è composto da tre parti:

- lo schermo al fosforo per la trasformazione dei raggi X in luce visibile;

- un supporto di conduzione in fibra ottica, per il raggiungimento da parte della radiazione visibile del CCD;
- il CCD, per il rilevamento della radiazione luminosa e la trasformazione in segnale elettrico.

Non appena i raggi colpiscono lo schermo al fosforo, essi vengono trasformati in radiazione luminosa; quest'ultima colpisce, quindi, i fotodiodi presenti nel CCD. A questo punto i fotodiodi diventano dei conduttori e la corrente che li attraversa va a scaricare dei condensatori direttamente collegati ad essi, caricati precedentemente, i quali avranno una tensione istantanea, ai loro capi, minore di quella di partenza e inversamente proporzionale al flusso fotonico.

In questo sistema ogni diodo rappresenta un *pixel*.

Allorché il periodo di integrazione del detector si è concluso, una serie di interruttori si chiudono e quindi la carica di ciascun condensatore viene trasferita ad un sistema di registrazione dati, composto da altri condensatori.

In seguito, la carica presente sui condensatori di registro viene trasmessa ad un convertitore A/D (analogico/digitale) che, infine, invia i dati al sistema di elaborazione. Dopo che questo trasferimento è avvenuto, gli interruttori vengono riaperti e i condensatori, attaccati ai fotodiodi, vengono ricaricati. A questo punto un nuovo ciclo può ricominciare. Caratteristiche di questo tipo di detector sono:

- capacità di rilevare radiazioni incidenti, anche per esposizioni prolungate, senza problemi di non linearità e di saturazione termica;
- basso rumore.

Tutte queste caratteristiche permettono di generare immagini 3D con un alto rapporto segnale/rumore (SNR, *Signal Noise Ratio*) e con un'elevata risoluzione spaziale.

3.4. Ricostruzione di un'immagine tomografica

La ricostruzione di un'immagine tomografica può essere realizzata a partire dai dati riguardanti i profili di attenuazione registrati nel fascio di raggi X, nelle diverse direzioni d'incidenza (38, 56, 59, 62). Sappiamo, infatti, che il campione viene fatto ruotare per piccoli incrementi angolari; dall'interazione del fascio di raggi con il campione, durante la rotazione, si ottiene un numero di immagini bidimensionali o proiezioni pari al numero degli angoli di rotazione; dalla composizione di queste proiezioni mediante algoritmi sofisticati si ottengono le *slice*.

Successivamente, si aggiunge al moto rotatorio dell'oggetto, anche il moto traslatorio del sistema sorgente-rilevatore, acquisendo, in tal modo, le *slice* del campione a diverse altezze: la loro sovrapposizione porta alla realizzazione di un'immagine tridimensionale (4, 38, 59, 61, 62).

I raggi X hanno un'elevata capacità di penetrazione degli oggetti a causa della lunghezza d'onda estremamente ridotta in confronto alle dimensioni del corpo esaminato; dunque, la radiazione prodotta dalla sorgente attraversa il campione, senza essere deviata e riducendosi in intensità (poiché l'interazione con la materia avviene, principalmente, in virtù dell'effetto fotoelettrico e Compton). Una volta che il rilevatore abbia reperito i dati riguardanti l'attenuazione complessivamente subita dal fascio di raggi, l'immagine può essere riprodotta attraverso un peculiare procedimento basato sulla Trasformata di Radon e che può essere così sintetizzato:

- si misura l'attenuazione di un fascio di raggi X in un numero elevato di traiettorie parallele attraverso lo strato corporeo in studio;
- si determina la componente di attenuazione avvenuta in ogni singolo *voxel* (volume corporeo elementare), attraverso un algoritmo specifico di ricostruzione di immagini tomografiche (retroproiezione);
- si realizza, infine, un display visivo sul monitor dei valori numerici ricostruiti.

L'immagine digitale è costituita da tanti quadratini, detti *pixel* (cioè elemento dell'immagine) caratterizzati ciascuno da un certo valore di grigio, in funzione della matrice numerica che lo descrive.

Per rumore si intende un peggioramento o perdita di una parte delle informazioni contenute nella immagine ed è una componente intrinseca, anche se indesiderata, dei processi di acquisizione e trattamento delle immagini. Gli elementi che concorrono alla determinazione della qualità di un'immagine sono la risoluzione di contrasto (numero di livelli di grigi distinguibili), l'uniformità spaziale (attribuzione dello stesso valore numerico a tutti i *pixel* relativi ad un'area omogenea e costante) e la linearità (rapporto di diretta proporzionalità tra la densità esistente in un punto dell'oggetto di riferimento e il valore registrato per il *pixel* corrispondente); queste proprietà vengono alterate, in modo più o meno importante, dalla componente spuria e inscindibile del segnale che è, appunto, il rumore (4, 38, 59, 62, 63). Tuttavia, aspetto fondamentale delle immagini digitali, è la possibilità di elaborazione attraverso l'applicazione di diversi tipi di algoritmo, da cui si ricavano i seguenti risultati:

- modifica delle caratteristiche intrinseche;
- ripristino delle caratteristiche originali;
- analisi;
- compressione;
- sintesi.

Tra tutte le possibili elaborazioni, la modifica delle caratteristiche intrinseche è di gran lunga quella cui più frequentemente si fa ricorso e può consistere nell'aumento del contrasto, nella riduzione del rumore di fondo, aumento della nitidezza, accentuazione dell'identificazione dei margini e la cancellazione dei *pixel* che non rientrano in un certo valore soglia (4, 38, 51, 59, 61, 62).

Le tecniche di ripristino delle caratteristiche originali dell'immagine rendono possibile l'annullamento delle modifiche effettuate con l'applicazione dei metodi precedentemente menzionati.

Le operazioni di analisi, di solito, non danno come risultato un'altra immagine ma producono informazioni numeriche o grafiche basate sulle caratteristiche dell'immagine originale; di queste fanno parte, ad esempio, la misurazione degli angoli od il calcolo della densità in aree specifiche. La compressione permette di memorizzare l'immagine eliminandone le informazioni ripetitive. Le tecniche di sintesi, infine, creano immagini a partire da altre o dai dati numerici grezzi e ad esse si ricorre nel caso in cui l'immagine desiderata non possa essere acquisita, per ragioni tecniche, o non esista affatto in forma fisica. Di tali procedure fanno parte sia le retroproiezioni multiple sia le più recenti ricostruzioni multiplanari (4, 38, 62).

Proprio in virtù della modalità di acquisizione delle immagini, nella microtomografia si ottengono due principali tipi di artefatti: gli artefatti ad anello (causati dalla disomogeneità del detector e, quindi, ridotti attraverso correzioni matematiche) e gli artefatti a stella.

Gli artefatti a stella, in particolare, consistono nella rappresentazione a stella di un punto. Tali alterazioni vengono causate dalla radiazione secondaria e rappresentano il limite più evidente della retroproiezione. Tuttavia, nota a priori l'immagine da ottenersi, è possibile correggere, preventivamente, le informazioni iniziali: ciascuna proiezione viene modificata matematicamente mediante l'equazione filtro che controbilancia l'artefatto a stella. Si parla in questo caso di retroproiezione filtrata e l'integrale che la descrive viene definito integrale di convoluzione (4).

3.5. Possibilità d'impiego

L'innovazione apportata dalla microtomografia risiede, come è noto, nell'offrire una possibilità di analisi di campioni di diversa natura, conservandone, al contempo, l'integrità e riproducendone immagini tridimensionali ad elevata risoluzione (57, 61, 62, 64).

La risoluzione spaziale di cui è possibile avvalersi, utilizzando il macchinario Skyscan 1072, è di $8\mu\text{m}$ e dipende dal numero di scansioni eseguite; inoltre, l'utilizzo di una radiazione monocromatica fa sì che si crei una maggiore sensibilità della microCT, alle più piccole variazioni di assorbimento di raggi X all'interno del campione (62).

L'insieme delle caratteristiche sopraccitate estende la possibilità d'impiego della microtomografia in ambiti differenti, che vanno dalla scienza dei materiali, all'elettronica, alla geologia, all'industria dei semiconduttori, all'archeologia, all'ingegneria biomedica e alla biologia (38).

Proprio in ambito biomedico, le modalità d'applicazione sono innumerevoli e ciò in virtù del fatto che, attraverso lo Skyscan software, non solo si ricostruiscono immagini tridimensionali dei campioni, ma si effettuano, anche, valutazioni legate alla loro struttura (51, 65, 66), è possibile acquisire delle informazioni di fondamentale importanza quali:

- analisi morfologiche (densitometria e misura della porosità);
- studio del comportamento dei materiali sotto sforzo (sviluppo e propagazione di cricche);
- valutazioni circa le proprietà strutturali di un materiale (caratterizzazione dei materiali multifasici e quantificazione dei difetti quali cricche) (38).

La letteratura riporta numerosissimi studi che, non solo dimostrano l'attendibilità e i vantaggi ottenibili dall'analisi microtomografica, ma che ci consentono di comprendere come tale metodica, in particolare in ambito biomedico e in ingegneria tissutale, abbia delle possibilità applicative praticamente infinite; difatti, i parametri determinabili attraverso la microCT sono stati messi al servizio dei più disparati campi d'indagine (14, 53, 67).

In generale, possiamo affermare che la maggior parte delle ricerche effettuate, abbia voluto porre l'accento sull'influenza che abbiano i parametri morfometrici sulle caratteristiche meccaniche del tessuto osseo e sulle proprietà osteoconduttive di biomateriali per la rigenerazione ossea (1, 67-70). Contemporaneamente, molti studi tendono alla dimostrazione dell'opportunità del ricorso ad una analisi morfometrica microtomografica, rispetto alle più consolidate, ma distruttive, tecniche della microscopia ottica ed elettronica (58, 63, 65).

3.5.1. Studi sulle caratteristiche meccaniche dell'osso

La letteratura mostra un vastissimo panorama di studi effettuati con tecnica microtomografica e finalizzati alla valutazione delle caratteristiche meccaniche del tessuto osseo (17, 67-71).

Importanti esempi di questo tipo di ricerca sono riconducibili alla individuazione della correlazione tra la suscettibilità alle fratture e i valori riguardanti la porosità, la densità e il grado di mineralizzazione (72-74). Mentre risultano piuttosto numerose le ricerche che hanno valutato alla microCT gli aspetti quali-quantitativi della componente trabecolare dell'osso, considerati responsabili di un suo aumento di fragilità, solo di recente le stesse valutazioni sono state effettuate sulla parte corticale (71).

La corticale ossea, infatti, è organizzata come una struttura compatta che ingloba una rete di pori rappresentati da un lato dai canali di Volkmann e di Havers e dall'altra dalle aree di riassorbimento. Per poterne valutare le proprietà è stato necessario aumentare la risoluzione spaziale della microtomografia, applicando una radiazione sincrotonica e, concentrare non più l'attenzione sui *pixel* rappresentanti il tessuto osseo, ma su quelli corrispondenti agli spazi vuoti,

aggiustando opportunamente gli algoritmi di binarizzazione; così facendo, è stato possibile invertire le immagini tridimensionali e considerare i pori come strutture pseudo-trabecolari e la controparte solida come pseudo-midollare. Confrontando, al contempo, i valori ottenuti alla microCT con quelli della microscopia elettronica a scansione, è stata sia convalidata l'attendibilità dell'analisi microtomografica nel determinare caratteristiche microarchitetture sia stabilita la dipendenza della resistenza ossea da fattori come la distribuzione dei pori e le loro dimensioni (18, 56, 71, 74, 75).

Assai più copiosi risultano gli studi che hanno analizzato l'osso trabecolare con la tecnica microtomografica. Molte delle indagini riportate in letteratura internazionale hanno considerato la riduzione della resistenza ossea cercando delle differenze nella microarchitettura rispetto al sesso e rispetto all'età (64, 69, 70, 76).

Questi studi oltre a confermare la stretta relazione esistente tra la resistenza delle trabecole ossee e il grado di mineralizzazione, nonché di questi due parametri rispetto al tipo di sollecitazione applicata, hanno evidenziato delle importanti diversità nell'organizzazione del tessuto osseo negli uomini e nelle donne. In particolare, grazie ai dati acquisiti con la microtomografia, è stata confermata l'eterogeneità del tessuto osseo nelle diverse aree dello scheletro sia nell'uomo che nella donna ed è stato inoltre possibile notare, inoltre, che nell'uomo, al livello del radio e del collo del femore, l'osso ha una struttura più resistente, perché più piatta, costituita da trabecole più spesse, più numerose e meno separate, rispetto agli stessi siti nella donna (60).

3.5.2. Studi sui biomateriali e sulla rigenerazione ossea

Negli ultimi anni, la microtomografia ha consentito di ampliare le conoscenze nel campo dell'ingegneria tissutale e della rigenerazione ossea, grazie al carattere non distruttivo dei processi analitici. In letteratura sono moltissimi gli studi che hanno incentrato la propria attenzione sulle caratteristiche microarchitetture dei biomateriali e sugli aspetti quali-quantitativi del tessuto osseo, ottenuto con metodiche rigenerative (49, 61, 76).

Un'attenzione particolare è stata dedicata, nelle indagini più recenti, alla correlazione tra le proprietà strutturali degli *scaffold* e la loro azione osteoconduttiva difatti, utilizzando la microCT come strumento d'analisi, sono stati identificati e misurati parametri fondamentali per il miglioramento dell'osteoconduzione, mediata da questi materiali (3, 55). Le proprietà strutturali ricavabili rispetto ad un *bioscaffold*, ad esempio, sono le seguenti:

- superficie dello *scaffold*;
- volume dello *scaffold*;
- volume totale;
- porosità del campione;
- spessore delle pareti dei pori;
- interconnettività;
- diametro dei pori;
- diametro medio dei pori;
- spessore medio delle trabecole (pareti dei pori).

Tali proprietà vengono ricavate degli indici primari o parametri morfometrici, calcolati dal software di ricostruzione, una volta scelta la regione d'interesse (*Region of Interest*, ROI), formata dai singoli *pixel* che compongono l'immagine 2D; nell'immagine 3D il calcolo viene esteso a tutte le *slice*. Se, poi, si considera il campione per piani, possono essere ricavati degli indici morfometrici secondari (1, 51, 59, 62, 77). Grazie a ciò è possibile studiare un campione di tessuto osseo e conoscerne i seguenti parametri primari:

- TV (*Tissue Volume*, mm³): volume totale d'interesse, ovvero la somma di tutti i *voxel*;

- BV (*Bone Volume*, mm³): la somma di tutti i *voxel* marcati come osso all'interno del volume d'interesse;
- TS (*Tissue Surface*, mm²): superficie totale d'interesse, rappresentata dalla somma di tutti i *pixel*;
- BS (*Bone Surface*, mm²): la somma di tutti i *pixel* marcati come osso all'interno della superficie d'interesse;
- BV/TV (*Percentage Bone Volume*, %): rappresenta il volume d'osso percentuale;
- BS/BV (*Specific Bone Surface*) (1/mm): rappresenta la superficie specifica.

Assumendo, poi, che l'osso trabecolare sia organizzato in infiniti piani con un certo spessore (Tb.Th.), una certa separazione (Tb.Sp.) e un determinato numero di trabecole per unità di lunghezza (Tb.N.), si otterranno, dall'integrazione di quelli primari, i seguenti parametri morfometrici secondari:

- Tb.Th. = 2BV/BS (*Trabecular Thickness*, mm): spessore delle trabecole,
- Tb.Sp. = 1/Tb.N. (*Trabecular Separation*, mm): distanza tra i margini delle trabecole (38, 53, 57, 59, 61, 62, 78).

Per il calcolo dei parametri morfometrici, un punto fondamentale è rappresentato dalla segmentazione delle immagini a livello di grigio, ovvero dalla discriminazione del tessuto osseo da ciò che lo circonda.

Il metodo utilizzato è stato quello di tipo a soglia uniforme, che ha come risultato un'immagine composta esclusivamente da *pixel* neri (osso) e da *pixel* bianchi (non osso) (51, 53, 62, 67, 78). Mediante l'utilizzo del software di ricostruzione, osservando l'istogramma dei livelli di grigio di una immagine, la soglia viene scelta esattamente tra i due picchi del suddetto istogramma rappresentanti i due materiali differenti. Tutti i livelli di grigio sotto il valore di soglia sono considerati osso, quelli al di sopra sono considerati non osso (6, 58, 61, 69, 78).

3.6. Ultrastruttura e istomorfometria

La caratterizzazione strutturale di un corpo può essere realizzata in modo sicuramente attendibile, ma non conservativo, ricorrendo all'istomorfometria e alla microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscopy*, SEM).

L'istomorfometria o istologia quantitativa è l'analisi su sezioni istologiche dei parametri riflettenti il riassorbimento, la neoformazione e la struttura del tessuto osseo (79). Essa è in grado di fornire informazioni non ottenibili con altre tecniche diagnostiche. In particolare, è la sola metodica che permette uno studio dell'osso a tre livelli: cellulare, tessutale e della singola unità di rimodellamento. Inoltre è l'unico approccio che consente di individuare un difetto di mineralizzazione attraverso una valutazione dinamica dell'attività osteoblastica. Infine, con la recente introduzione di nuovi metodi di misura che permettono la valutazione anche della microarchitettura e dell'organizzazione delle trabecole, la metodica può anche essere definita come un'analisi computerizzata d'immagini acquisite da sezioni istologiche (che devono essere opportunamente preparate) (68, 79). Per queste misurazioni viene utilizzato un microscopio ottico con ingrandimenti da 2,5 ad almeno 40X collegato ad una telecamera analogica (3CCD) o digitale, per l'acquisizione delle immagini istologiche. Le immagini immagazzinate vengono inviate ad un computer con il quale, attraverso l'ausilio di un software specifico, vengono effettuate le misurazioni dei diversi parametri morfometrici, molti dei quali sono sovrapponibili a quelli primari e secondari ricavabili, in modo non distruttivo, dall'analisi microtomografica (63, 65, 66, 68, 79, 80, 81).

Il SEM utilizza un fascio di elettroni che viene accelerato sul campione in studio, all'interno di una camera sotto vuoto spinto, e una differenza di potenziale dell'ordine dei chilovolt tra il campione e il filamento di emissione. Un detector provvede a rilevare gli elettroni riflessi dal corpo che vengono trasformati dal computer in immagini tridimensionali. In tal modo vengono esaminate dettagliatamente le caratteristiche superficiali, mentre non è diagnosticabile con esattezza il tipo di tessuto presente. È possibile attraverso particolari tecniche ausiliarie, procedere ad un'analisi chimica semiquantitativa dei componenti (12, 38).

In questo tipo di microscopia il campione non viene tagliato, ma viene trattato con polveri di metalli pesanti vaporizzati che lo rendono riflettente agli elettroni. Inoltre, l'acqua presente nei tessuti deve essere eliminata, poiché evaporando potrebbe contaminare la camera elettronica; il processo di evaporazione può determinare contrazione da disidratazione (32). L'alterazione delle caratteristiche originali del tessuto è comunque irreversibile.

4. INDAGINE SPERIMENTALE

4.1. Materiali e metodi

La presente indagine sperimentale è stata realizzata presso il Dipartimento di Tecnologie e Salute dell'Istituto Superiore di Sanità ora Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica.

Il fine di questo studio è la caratterizzazione morfometrica di sei biomateriali di diversa origine e composizione e attualmente presenti in commercio:

- blocchetto di spongiosa iliaca umana deantigenata e disidratata di dimensioni 9x15x10 mm (Regeneration Technologies),
- blocchetto di spongiosa equina deantigenata e disidratata di dimensioni 3x25x25 mm (Osteoplant Flex, Bioteck),
- blocchetto di spongiosa bovina di dimensioni 1x1x2 cm (Bio-Oss, Geistlich biomaterials),
- calcio fosfato in granuli da 2-4 mm (Calcibon, Biomet),
- tricalcio fosfato in granuli da 2-3 mm (Bioset TCP, Kasios),
- blocchetto di idrossiapatite sintetica di dimensioni 10x5x5 mm (ENGIpore, Finceramica).

Prendendo in esame le schede con cui sono messi sul mercato i prodotti utilizzati in questo studio sperimentale, sono state ricavate le seguenti informazioni e caratteristiche:

- La spongiosa iliaca umana è posta in commercio dopo essere stata sottoposta ad un processo attraverso il quale si possono conservare la componente minerale e la matrice ossea, previa rimozione delle componenti indesiderate come grassi, cellule, antigeni e inattivazione di eventuali agenti patogeni presenti. La scheda del prodotto ne indica l'utilizzo per interventi di rigenerazione attraverso *inlay*, previa immersione del blocchetto in soluzione fisiologica sterile per cinque minuti. È consigliata la realizzazione di fori del diametro di 1,1 mm nel sito ricevente, l'immobilizzazione dell'innesto con viti da osteosintesi del diametro di 1,5 mm e la sua protezione con membrana riassorbibile. È riportato un tempo di completa integrazione di 4 mesi.
- La spongiosa equina è sottoposta ad un processo di deantigenazione e disidratazione e deve essere reidratata con soluzione fisiologica, prima del suo utilizzo. Secondo la scheda, il prodotto è indicato per ricostruzioni scheletriche cranio facciali, può essere sottoposto a fresature e stabilizzazioni, mediante mezzi di sintesi, e i vari formati possono essere sovrapposti, per poter raggiungere lo spessore desiderato. Non deve essere utilizzato in cavità ossee che presentino focolai infettivi. Il tessuto viene in breve tempo remineralizzato, mantenendo volumi costanti. Viene totalmente riassorbito per azione osteoclastica e sostituito da osso neoformato nel corso di 6/12 mesi. L'innesto non provoca reazione da parte del sistema immunitario o la formazione di tessuto fibroso.
- La spongiosa bovina è un minerale osseo naturale di origine bovina con proprietà osteoconduttive, ottenuto tramite un processo di purificazione in diverse tappe che si attiene alle più severe norme di sicurezza. Essendo di origine animale è del tutto paragonabile sia chimicamente che strutturalmente all'osso umano mineralizzato (apatite naturale nano cristallina); il prodotto è dotato, infatti, di micro e macroporosità simili a quelle della spongiosa umana. La formazione di nuovo osso nella sede dell'impianto è favorita dal grande volume dei pori collegati tra loro. L'utilizzo di spongiosa bovina in blocchi è consigliato per la rigenerazione di ampi difetti ossei, avendo l'accortezza di porre il

biomateriale a diretto contatto con il tessuto osseo circostante (previa rimozione di eventuale tessuto di granulazione), e ricoprendolo con membrana. È possibile modellare il blocchetto in base alle dimensioni necessarie e imbibirlo con sangue del paziente o soluzione fisiologica sterile. La casa produttrice non esclude in modo assoluto la probabilità di reazioni da incompatibilità. Il materiale va in contro a rimodellamento fisiologico da parte di osteoclasti e osteoblasti.

- Il calcio fosfato è un biomateriale di sintesi con azione osteoconduttiva, costituito da idrossiapatite microcristallina decalcificata sottoforma di granuli di 2-4 mm. I granuli presentano macropori (150-550 μm) che favoriscono la colonizzazione da parte delle cellule ossee. I macropori sono separate tra loro da sottili pareti che delimitano la rete dei micropori (<10 μm) la quale è funzionale al processo di rimodellamento. Grazie alla loro struttura i granuli possono essere sottoposti a forze compressive di 4-7 MPa. La scheda del prodotto ne indica l'impiego nella ricostruzione e nel riempimento di difetti ossei anche ampi, in associazione a membrane; inoltre può essere utilizzato da solo o con PRP, aspirato midollare, sangue e innesti di osso autologo. Se richieste, sono possibili la fissazione e stabilizzazione nel sito ricevente. È totalmente biodegradato attraverso processi cellulari.
- Il tricalcio fosfato è un sostituto osseo di sintesi fornito in granuli, barrette, blocchetti e cunei di diverse grandezze e in diversi quantitativi. Il materiale si presenta con pori totalmente interconnessi del diametro di 200-500 μm e con una porosità complessiva del 60-80%. Viene sottoposto ad un processo di sterilizzazione ai raggi gamma ed è biocompatibile e biodegradabile. È descritto come un materiale fortemente bioattivo e quasi o totalmente riassorbibile adatto alla rigenerazione di difetti ossei di diversa origine e ampiezza. La formulazione in granuli riempie completamente cavità di forma irregolare. La radiopacità consente screening radiografici a lungo termine.
- L'idrossiapatite sintetica è un sostituto osseo a base di bioceramica mimetica; la porosità raggiunge il 90% del suo volume con macropori in un range di 200-500 micron e pori di interconnessione nel range di 80-200 micron. Questa struttura e le caratteristiche morfologiche microstrutturali consentono al biomateriale, appena applicato "in situ", di assorbire a tutto spessore le proteine bioattive e i fattori di crescita presenti nel coagulo e di rilasciarli progressivamente, generando una rapida vascolarizzazione e rendendo più efficace l'osteogenesi. È descritta un'alta biocompatibilità: il prodotto è sottoposto a test di genotossicità, carcinogenicità, citotossicità, irritazione e sensibilizzazione. La scheda del prodotto riporta delle caratteristiche di elevata capacità osteoconduttiva, stabilità e resistenza meccanica, ottima adattabilità e lavorabilità del materiale, alta superficie di contatto. Il prodotto è disponibile sia in blocchetti preformati rigidi sia in scaglie da 0,5-1 mm, utilizzabili in chirurgia orale e maxillo-facciale e in parodontologia, per rigenerazione di difetti ossei anche di dimensioni importanti. Viene riportata una cinetica di osteointegrazione di circa 9-18 mesi.

L'analisi microtomografica dei campioni menzionati è stata realizzata attraverso l'utilizzo della strumentazione SkyScan 1072.

Le fasi in cui si articola il processo analitico sono le seguenti:

1. preparazione e settaggio della strumentazione;
2. acquisizione dati;
3. ricostruzione delle sezioni trasversali;
4. segmentazione delle immagini e calcolo dei parametri istomorfometrici;
5. analisi tramite software di supporto.

I campioni sono stati montati su degli appositi supporti di forma cilindrica con il loro asse maggiore coincidente con quello di rotazione del piano dello scanner. È di fondamentale importanza

per l'attendibilità e per la riproducibilità dell'analisi che i campioni vengano immobilizzati sul supporto rotante e posizionati in modo da risultare centrati rispetto all'asse di rotazione di questo (a tal fine possono essere utilizzati della plastilina o del nastro biadesivo) (59).

Immobilizzato e centrato ciascun campione, questo è stato poi posizionato all'interno del macchinario; dunque, sono stati attivati il comando di chiusura automatica del coperchio e quello per l'emissione dei raggi X. Sfruttando le immagini dei campioni ottenibili prima del processo di acquisizione, è stato possibile stabilire ogni volta i parametri più adeguati ad una corretta scansione, ovvero:

- la distanza fra sorgente e campione, al fine di ingrandire il campione in maniera desiderata nella fase di acquisizione;
- la risoluzione;
- il filtraggio;
- l'incremento dell'angolo di rotazione.

Per scegliere i valori dei parametri di acquisizione si è verificato di volta in volta che tipo di immagine si sarebbe ottenuta, scegliendo la più idonea per gli scopi prefissati.

L'acquisizione dei dati è stata considerata migliore, applicando i seguenti parametri:

- Tensione: 100 kV,
- Corrente: 98 μ A,
- Materiale del Filtro: 1 mm di alluminio (dispositivo per minimizzare gli artefatti),
- Risoluzione spaziale: 11 micron per *voxel-size*,
- Angolo di rotazione: 0,45°,
- Quantità di *slice* assiali definite per l'acquisizione micro-CT: circa 800,
- Spessore delle *slice* definite per l'acquisizione micro-CT: 10 micron.

Poiché i campioni presentano dimensioni differenti, sono state stabilite per ciascuno diversi gradi di magnificazione e di risoluzione riportati di seguito:

- *campione omologo*: magnificazione di 18X corrispondente ad una risoluzione di 16,3 micron *pixel-size*,
- *campione eterologo equino*: magnificazione di 40x corrispondente ad una risoluzione di 7,3 micron *pixel-size*,
- *campione eterologo bovino*: magnificazione 25x corrispondente ad una risoluzione di 11,29 micron *pixel-size*,
- *solfo di calcio*: magnificazione di 80x, corrispondente ad una risoluzione di 3,7 micron *pixel-size*,
- *fosfato tricalcico*: magnificazione di 80x, corrispondente ad una risoluzione di 3,7 micron *pixel-size*.

Per ognuno dei biomateriali studiati sono state ottenute, inizialmente, delle proiezioni, ovvero immagini bidimensionali (Figura 1).

Dalle immagini delle proiezioni bidimensionali, grazie all'impiego di un software specifico sono state ricostruite le sezioni trasversali delle quali, in questa sede, verranno riportate, per ogni campione, solo le più significative.

Scegliendo poi dalle ricostruzioni trasversali un'area d'interesse (ROI), è stato effettuato il procedimento di binarizzazione o *thresholding* funzionale all'acquisizione dei parametri morfometrici e alle ricostruzioni tridimensionali (Figura 2). Con questo procedimento l'immagine a livello di grigio viene elaborata in modo che se ne ottenga una in cui, invece, siano presenti solo *pixel* bianchi o neri; in tal modo si effettua una netta distinzione tra la fase osso (*pixel* neri) e quella non osso (*pixel* bianchi). Questo procedimento è preliminare all'ottenimento delle immagini tridimensionali e al calcolo dei parametri morfometrici.

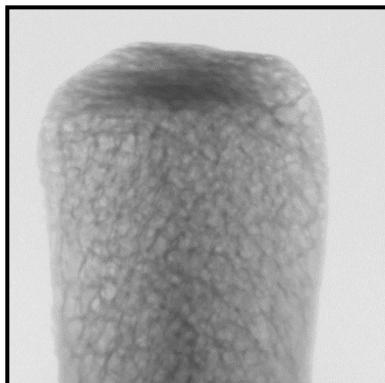


Figura 1. Proiezione frontale di campione omologo di osso umano

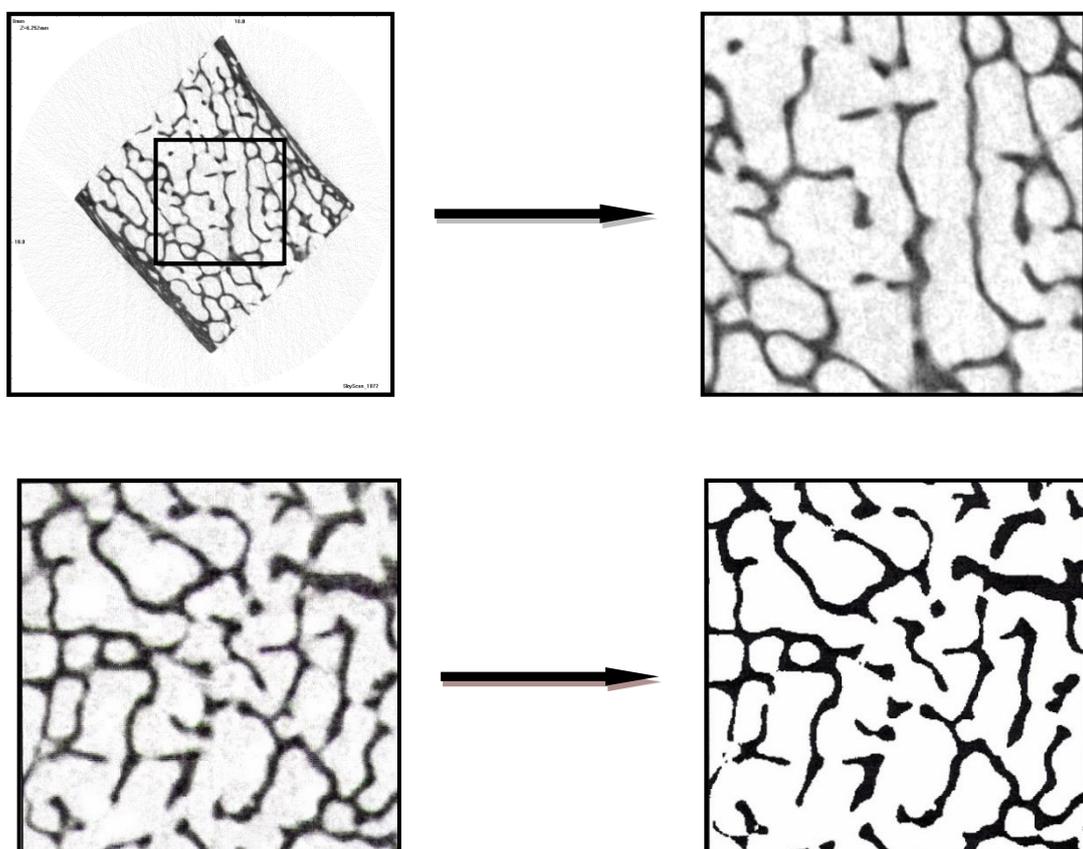


Figura 2 Identificazione dell'area di interesse di campione omologo di osso umano con il quadrato disegnato nell'immagine a sx in alto, che si può osservare ingrandito a dx in alto e operativamente poi analizzare con software specifico per la successiva binarizzazione nelle immagini in basso

È stata poi effettuata l'analisi microscopica dei campioni attraverso l'utilizzo del programma dedicato. Questo software permette di visualizzare sullo schermo sia l'immagine ombra del campione, cioè la proiezione bidimensionale ottenuta dallo Skyscan, sia la successione di *slice* in cui questo è stato sezionato.

Infine, grazie al programma software specifico, sono state realizzate immagini tridimensionali dei campioni a partire dai dati bidimensionali (59).

4.2. Risultati

Per ciascun campione sono state prodotte, tramite microtomografia 3D, centinaia di *slice*. Se ne riportano solo alcune per ogni campione e ciascuna corrispondente alla sezione indicata nell'immagine proiezione, posta a sinistra, dal livello indicato dalla linea rossa (Figura 3-8).

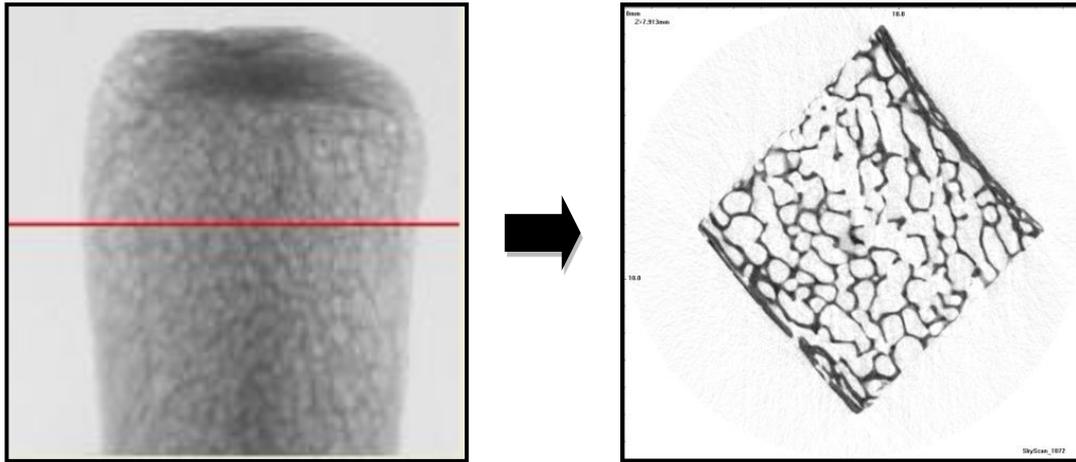


Figura 3. OSSO OMOLOGO: proiezione bidimensionale del campione e ricostruzione trasversale corrispondente all'altezza indicata con una linea nell'immagine di sx

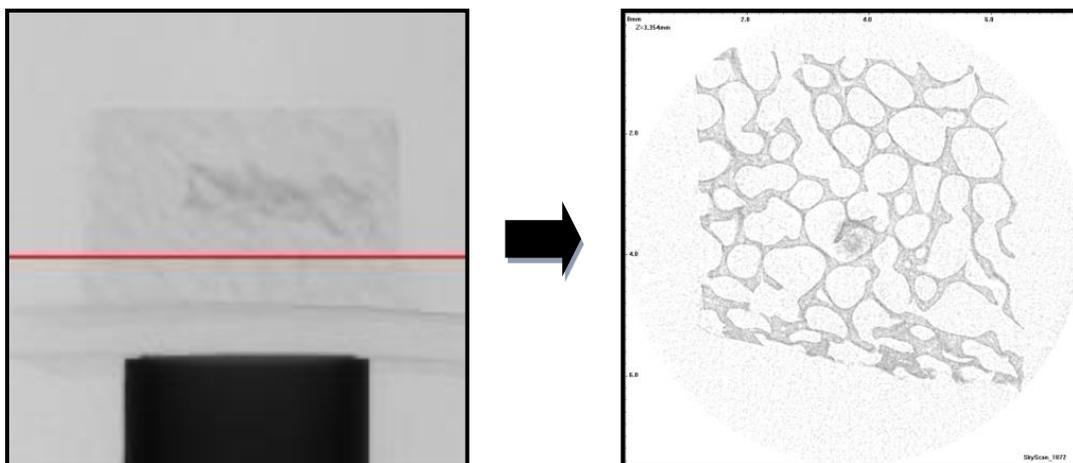


Figura 4. OSSO EQUINO: proiezione bidimensionale del campione e ricostruzione trasversale corrispondente all'altezza indicata con una linea nell'immagine di sx

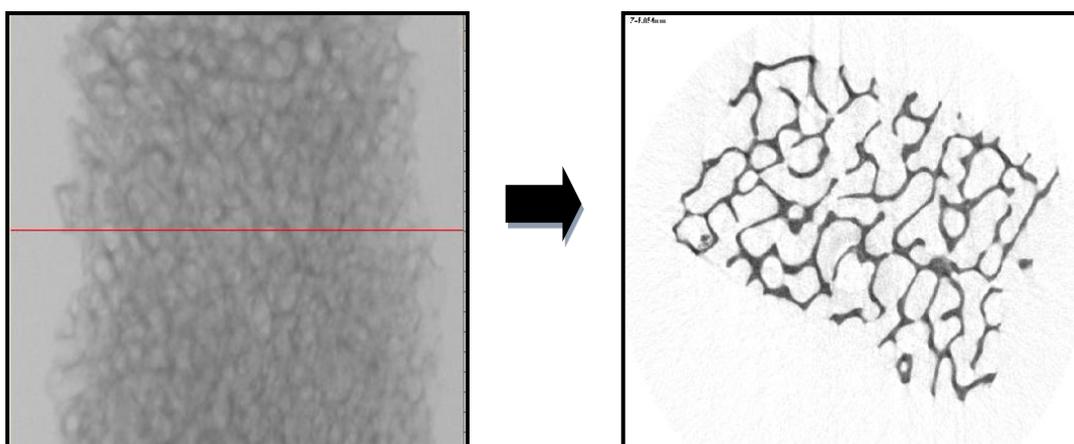


Figura 5. OSSO BOVINO: proiezione bidimensionale del campione di e ricostruzione trasversale corrispondente all'altezza indicata con una linea nell'immagine di sx

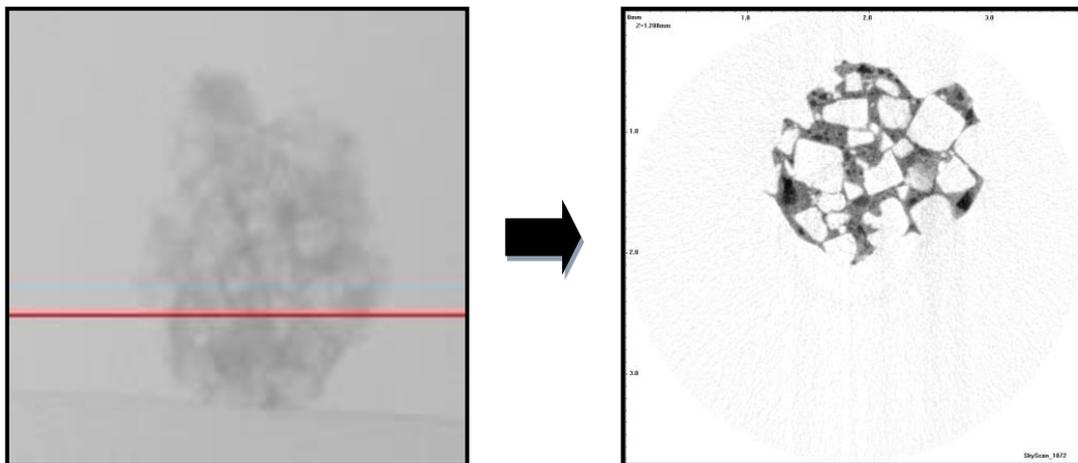


Figura 6. FOSFATO DI CALCIO: proiezione bidimensionale del campione e ricostruzione trasversale corrispondente all'altezza indicata con una linea nell'immagine di sx

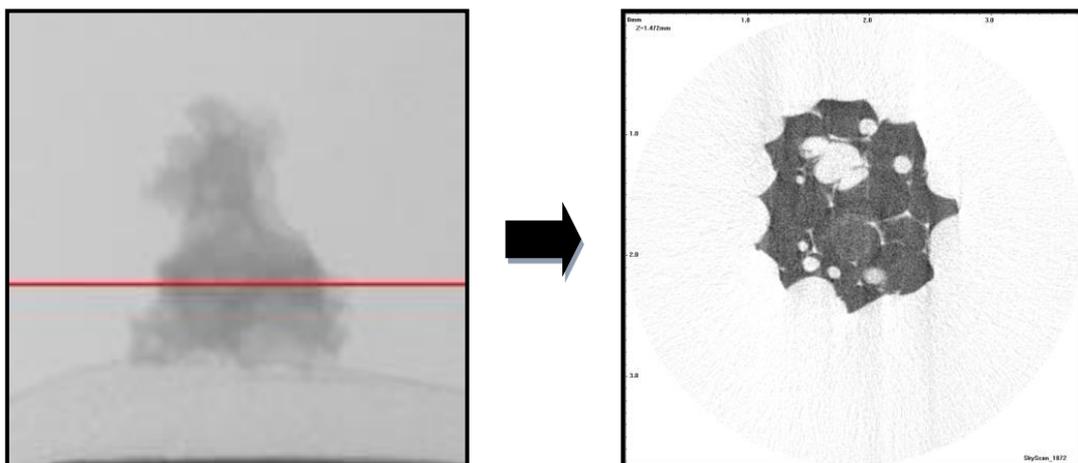


Figura 7. TRICALCIO FOSFATO: proiezione bidimensionale del campione e ricostruzione trasversale corrispondente all'altezza indicata con una linea nell'immagine di sx

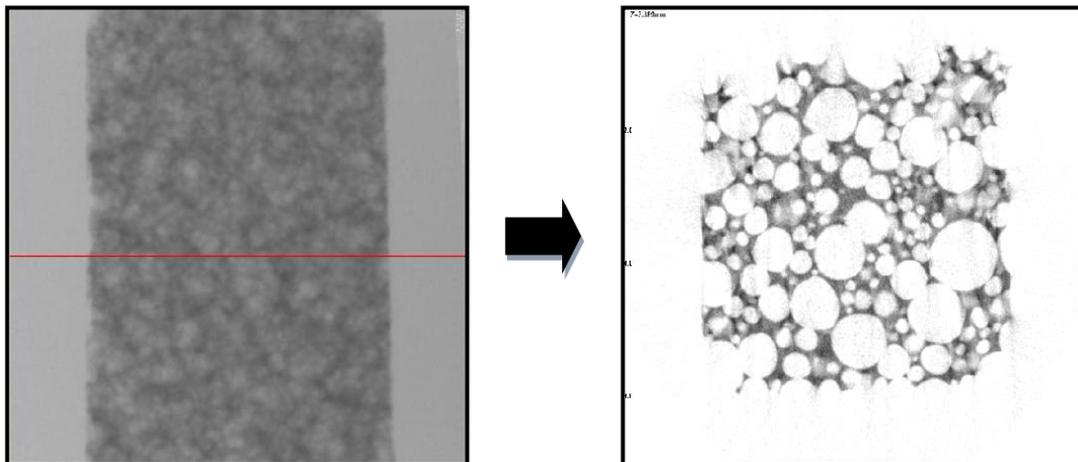


Figura 8. IDROSSIAPATITE: proiezione bidimensionale del campione e ricostruzione trasversale corrispondente all'altezza indicata con una linea nell'immagine di sx.

Di seguito vengono riportate le ricostruzioni tridimensionali dei campioni ottenute attraverso il programma software specifico e ad esse vengono affiancati dei dettagli realizzati ad ingrandimento 18X, 40X, 80X e le ricostruzioni in negativo di questi ultimi (Figure 9-14).

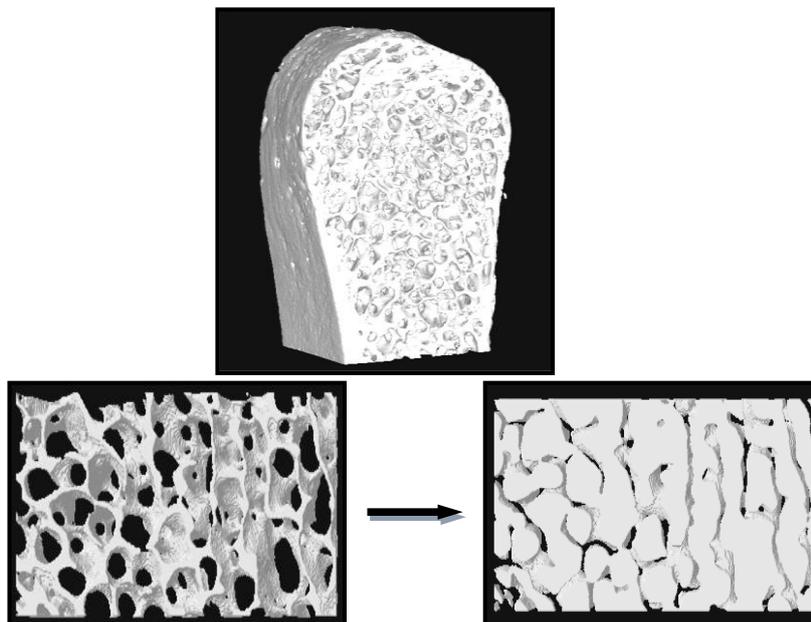


Figura 9. OSSO OMOLOGO: ricostruzione tridimensionale del campione (in alto). Sezione dell'immagine 3D (in basso a sx) e sua ricostruzione in negativo (in basso a dx) per la visualizzazione dell'interconnettività

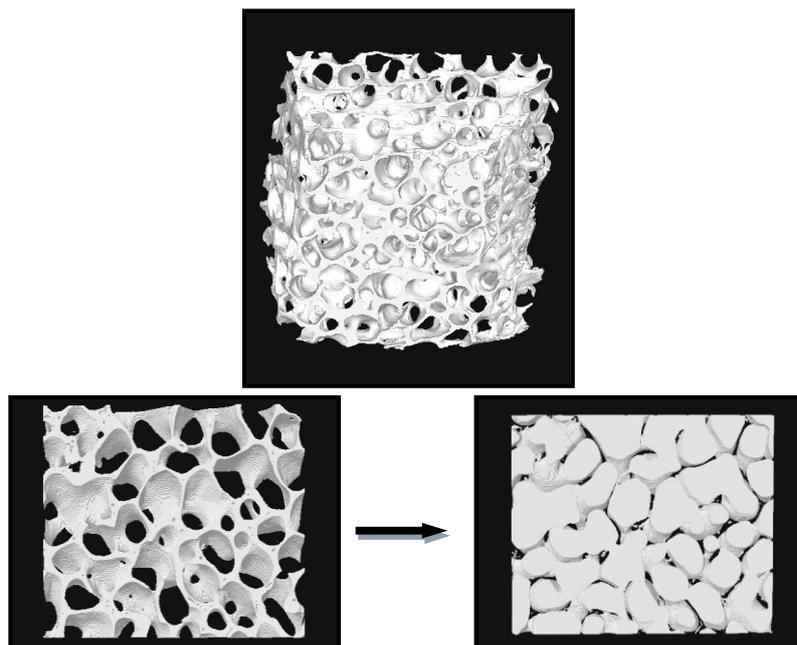


Figura 10. OSSO EQUINO: ricostruzione tridimensionale del campione (in alto). Sezione dell'immagine 3D (in basso a sx) e sua ricostruzione in negativo (in basso a dx) per la visualizzazione dell'interconnettività

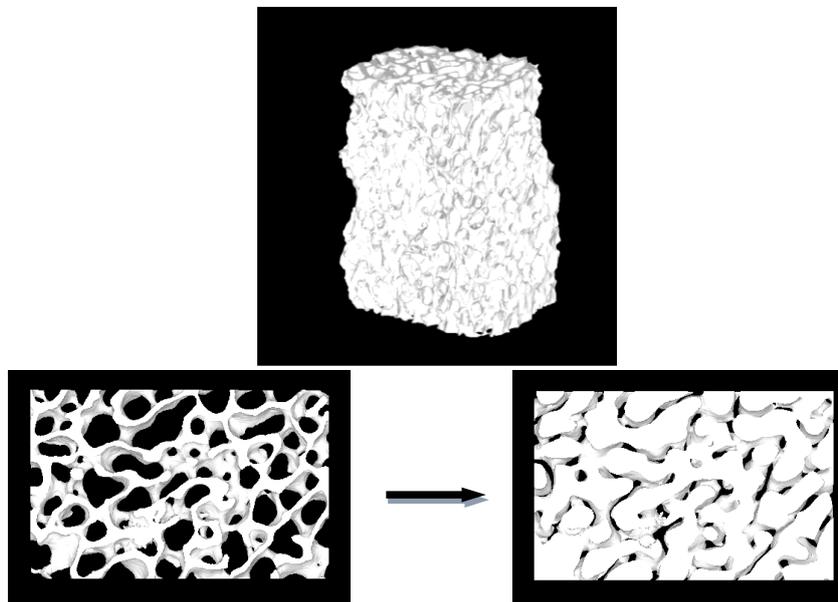


Figura 11. OSSO BOVINO: ricostruzione tridimensionale del campione (in alto). Sezione dell'immagine 3D (in basso a sx) e sua ricostruzione in negativo (in basso a dx) per la visualizzazione dell'interconnettività

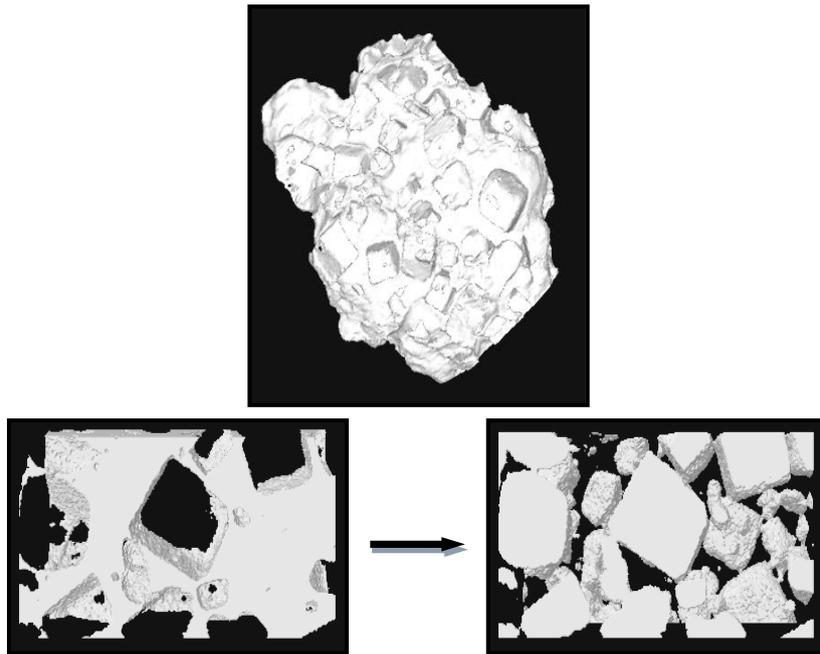


Figura 12. FOSFATO DI CALCIO: ricostruzione tridimensionale del campione (in alto). Sezione dell'immagine 3D (in basso a sx) e sua ricostruzione in negativo (in basso a dx) per la visualizzazione dell'interconnettività

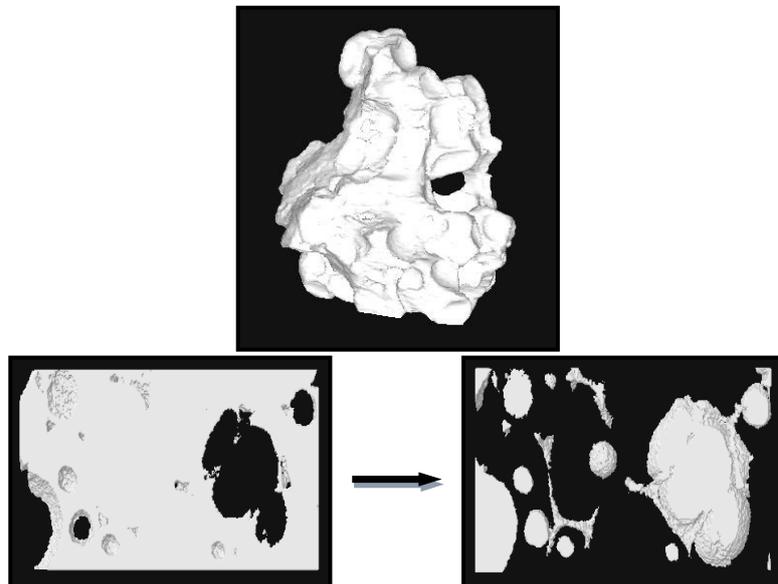


Figura 13. TRIFOSFATO CALCICO: ricostruzione tridimensionale del campione (in alto). Sezione dell'immagine 3D (in basso a sx) e sua ricostruzione in negativo (in basso a dx) per la visualizzazione dell'interconnettività

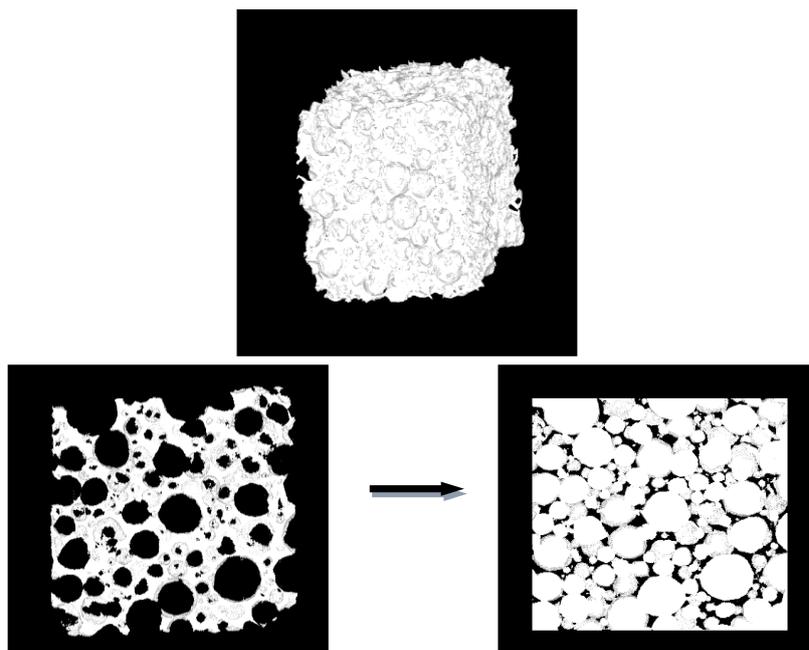


Figura14. IDROSSIAPATITE: ricostruzione tridimensionale del campione (in alto). Sezione dell'immagine 3D (in basso a sx) e sua ricostruzione in negativo (in basso a dx) per la visualizzazione dell'interconnettività

Infine, nella Tabella 1 sono riportati i parametri morfometrici calcolati tramite il software specifico dedicato.

Tabella 1. Parametri morfometrici dei campioni analizzati tramite microtomografia 3D

Parametri morfometrici	Osso omologo	Osso equino	Osso bovino	Calcio fosfato	Tricalcio fosfato	Idrossiapatite
Porosità (%)	75,52	75,00	87,65	55,20	15,00	77,04
BV/TV(%)	24,48	25,00	12,35	44,80	85,00	22,96
BS/BV(mm)	22,50	38,36	18,22	54,98	17,65	29,01
TbTh (µm)	88,89	52,14	177,23	36,36	113,32	128,96
TbSp (µm)	274,20	155,70	517,00	44,80	19,20	528,76

Ciascuno dei parametri riportati assume uno specifico valore numerico che consente di caratterizzare ogni singolo *scaffold* sia da un punto di vista strutturale che da un punto di vista meccanico.

Per porosità si intende il rapporto percentuale tra area occupata da cavità delimitate da struttura trabecolare e area totale.

Il BV/TV (%) esprime la percentuale di volume del campione rispetto al tessuto totale esaminato ed è il principale determinante della resistenza ossea.

Per BS/BV (1/mm) si intende il rapporto tra la superficie occupata dalla componente solida e il suo volume.

Il Tb.Th. (mm) indica lo spessore medio delle trabecole ossee in una zona definita, mentre il Tb.Sp. (mm) la separazione media trabecolare o distanza media tra le trabecole.

La connettività è, invece, un parametro cui non è stato assegnato un valore numerico ma che viene, chiaramente, messo in luce attraverso la visualizzazione delle immagini tridimensionali ricostruite in negativo (1, 59).

4.3. Discussione e conclusioni

Grazie alla tecnica microtomografica si fa fronte all'esigenza di conoscere e visualizzare le caratteristiche strutturali di un supporto osseo, in modo assolutamente non distruttivo e non invasivo. A questa innovazione, di indubbio vantaggio, si associa anche la possibilità di analizzare e riprodurre strutture tridimensionali a partire da *slice* del campione, realizzabili in ogni direzione e livello (59, 62).

Il presente studio ha messo a punto l'applicazione di tale tecnologia al fine di caratterizzare dal punto di vista morfometrico diversi biomateriali e sfruttare, dunque, i dati ottenuti per l'identificazione dello *scaffold* più idoneo ad ogni specifica esigenza chirurgica.

Conditio sine qua non affinché un biomateriale possa essere innestato e/o trapiantato è che esso sia biocompatibile. Come migliore definizione di biocompatibilità viene tuttora accettata quella formulata da alcuni ricercatori (82), secondo la quale: Un biomateriale è compatibile con il tessuto circostante se l'interfaccia tra tessuto vivente e materiale assomiglia il più possibile alle aree interfacciali naturali che vi si trovano.

Nelle fasi successive ad un innesto, infatti, si verificano dei complessi processi di migrazione, differenziamento e proliferazione cellulare, i quali portano infine alla neoformazione ossea. La presenza di una matrice osteoconduttrice tridimensionale che abbia delle caratteristiche strutturali più simili possibile al tessuto osseo umano facilita notevolmente il processo rigenerativo (9, 2, 10).

Uno *scaffold* ideale dovrebbe possedere caratteristiche quali un'alta porosità, un'ampia superficie disponibile per l'adesione cellulare, dei pori sufficientemente ampi e dotati di vasta interconnettività in modo da consentire la penetrazione di strutture vascolari neoformate (3, 58).

Alla luce di quanto affermato e dell'analisi dei dati ottenuti, è possibile identificare nella spongiosa di origine equina il biomateriale strutturalmente più simile all'osso umano: una sufficiente porosità (75%) e un adeguato valore di *Specific Bone Surface* (38,36 mm) e di *Trabecular Separation* (155,7 micron) consentono e favoriscono tutti quei processi precedentemente menzionati e legati alla colonizzazione dello *scaffold* da parte di tessuto osseo neoformato; inoltre, i parametri *Percentage Bone Volume* (25%) e *Trabecular Thickness* (52-24 micron) garantiscono al materiale eterologo delle caratteristiche meccaniche congruenti con quelle della controparte umana.

La spongiosa di origine bovina, rispetto all'osso umano, presenta dei valori notevolmente più elevati di porosità percentuale (87,64%) e di *Trabecular Separation* (517 micron), ma molto inferiori di *Specific Bone Surface* (18,22 mm), di *Percentage Bone Volume* (12,35%) e di *Trabecular Thickness* (177,23 μm): questi parametri identificano un biomateriale certamente in grado di favorire in maniera ottimale l'attecchimento e la replicazione cellulare, ma, allo stesso tempo, dotato di proprietà meccaniche più scarse.

Tra i derivati di sintesi, il biomateriale più simile al tessuto osseo umano si è rivelato l'idrossiapatite sintetica: ha mostrato dei valori paragonabili a quelli del campione omologo, per ciò che riguarda i parametri della porosità percentuale (77,04%), *Percent Bone Volume* (22,96%) e *Specific Bone Surface* (29,01 mm), tuttavia, risultano assai differenti quelli riguardanti lo spessore trabecolare (128,96 μm) e la separazione tra i margini delle trabecole (528,76 μm).

Per quanto concerne il calcio fosfato e il tricalcio fosfato, i valori riportati identificano dei materiali certamente assai compatti, dotati di una porosità ridotta (calcio fosfato 55,2% e tricalcio fosfato 15%), di una minore separazione trabecolare (calcio fosfato 44,8 μm e tricalcio fosfato 19,2 μm), di un maggior valore di *Percent Bone Volume* (calcio fosfato 44,8% e trifosfato calcico 85%) e di *Trabecular Thickness* (calcio fosfato 36,38 μm e trifosfato calcico 113,32 μm): tali parametri descrivono questi biomateriali come scarsamente disponibili alla colonizzazione di cellule osteogenetiche e vasi neoformati, da un lato, ed esprimono, dall'altro, una maggiore resistenza meccanica.

L'osservazione delle immagini tridimensionali (*vedi* Figure 9-14) non solo rende comprensibile in modo più immediato quanto è stato affermato finora, ma consente di porre attenzione alla caratteristica interconnettività dei campioni, ovvero al concetto di *Connectivity Density*. Questo parametro, pur non essendo identificato da un valore numerico, viene studiato attentamente, perché descrive il tipo di comunicazione spaziale esistente tra i pori di uno *scaffold*: la presenza di connessioni favorisce enormemente la migrazione di fluidi, cellule e vasi neoformati e, in ultima analisi, la rigenerazione ossea, nell'intero volume dello *scaffold* (1, 3, 6, 57).

Le immagini tridimensionali ricostruite in negativo mettono chiaramente in evidenza la presenza di una discreta interconnessione tra i pori presenti nel campione di origine equina (*vedi* Figura 10) e di origine bovina (*vedi* Figura 11); tra i derivati sintetici, mentre il fosfato di calcio (*vedi* Figura 12) e il tricalcio fosfato (*vedi* Figura 13) mostrano una struttura interna assai compatta e dotata di minore connettività, l'idrossiapatite sintetica (*vedi* Figura 14), invece, risulta caratterizzata da una interconnettività sicuramente maggiore e paragonabile a quella dei campioni di origine eterologa.

L'obiettivo dell'indagine sperimentale effettuata è stata quella di convalidare l'attendibilità della microtomografia nella caratterizzazione di sei sostituti ossei, presenti in commercio, ottenendo delle informazioni preziose per il loro utilizzo nella pratica chirurgica.

Grazie ai dati ricavati è stato possibile mettere in evidenza per ciascuno *scaffold*, le proprietà morfometriche favorevoli ai fini del processo rigenerativo ed effettuare delle comparazioni.

Lo studio ha rappresentato un'opportunità per un'ulteriore messa a punto della tecnica microtomografica che, in modo sempre più proficuo, sta accompagnando in questi ultimi anni la ricerca sui biomateriali estendendone le conoscenze e le ambizioni.

Il vantaggio offerto dall'utilizzo della microtomografia consiste nella possibilità di analizzare campioni di piccole dimensioni, senza che essi debbano essere distrutti o alterati in alcun modo; si tratta, dunque, di una metodica d'indagine assolutamente non invasiva né distruttiva che, oltre a fornire dati circa la struttura interna dei corpi da un punto di vista quali-quantitativo, ne consente riproduzioni grafiche tridimensionali ad elevatissima risoluzione.

Queste qualità hanno fatto in modo che, in diversi ambiti, tale tecnica d'analisi abbia sostituito metodiche tradizionali come la microscopia ottica ed elettronica. Il macchinario Skyscan 1072 è, infatti, presente in Italia in tre diversi centri, e il suo utilizzo è ormai consolidato anche nel resto dell'Europa e del mondo.

In seguito questo tipo di metodica potrà contribuire: alla realizzazione di *scaffold* con caratteristiche strutturali ideali; alla caratterizzazione morfometrica di campioni di tessuto osseo, precedentemente innestato con un dato biomateriale; ad effettuare una valutazione circa la risposta a stimolazioni di carattere chimico, fisico e termico di biomateriali e tessuto osseo. Le più grandi aspettative e ambizioni riguardano l'utilizzo della microtomografia, nell'ambito dell'ingegneria tissutale: ci si propone di identificare le proprietà più idonee alla realizzazione di matrici biocompatibili tridimensionali, che fungano non solo da substrato ma soprattutto da *delivery system* per cellule mesenchimali e fattori di crescita nella rigenerazione dei tessuti e, quindi di monitorare e conoscere le proprietà del tessuto osseo neoformato, sia *in-vitro* che *ex-*

vivo, risultante dalla combinazione di cellule progenitrici, biomolecole e biomateriali osteconduttori.

BIBLIOGRAFIA

1. van Lenthe GH, Hagenmuller H, Bohner M, Hollister SJ, Meinel L, Muller R. Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction *in vivo*. *Biomaterials* 2007;28(15):2479-90.
2. Di Stefano DA, Cazzaniga A. *Chirurgia ossea ricostruttiva pre- e perimplantare*. Milano: Elsevier; 2008.
3. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(4):277-84.
4. Bedini R, Pecci R, Ioppolo P, Meleo D, Bianco A, Casti P. *Proposta di valutazione microtomografica di alcuni sostituti ossei*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009 (Rapporti ISTISAN 09/10).
5. Jensen Ole T, DDS, MS. *Gli innesti del seno mascellare in implantologia*. Milano: Scienza e Tecnica Dentistica Edizioni Internazionali; 2000.
6. Komlev VS, Peyrin F, Mastrogiacomo M, Cedola A, Papadimitropoulos A, Rustichelli F, Cancedda R. Kinetics of *in vivo* bone deposition by bone marrow stromal cells into porous calcium phosphate scaffolds: an X-ray computed microtomography study. *Tissue Eng* 2006;12(12):3449-58.
7. Piattelli A. Biomateriali utilizzati in rigenerazione ossea. *Implantologia orale* 2003;4:77-80.
8. Pilloni A, De Luca M. Effetto coadiuvante di un estere dell'acido ialuronico in terapia rigenerativa guidata con membrane in ePTFE e osso autologo nel trattamento dei difetti infraossei parodontali. *Quintessenza Internazionale* 2003;6:29-33.
9. De Franco M, Fornara R, Mangano C, Piattelli A. *Fattori di crescita e biomateriali. Rigenerazione ossea in odontostomatologia*. Milano: Edizioni Edra; 2000.
10. Berengo M, Bacci C, Sartori M, Perini A, Della Barbera M, Valente M. Histomorphometric evaluation of bone grafts harvested by different methods. *Minerva Stomatol* 2006;55(4):189-98.
11. Bartolucci EG. *Atlante di chirurgia perimplantare*. Milano: RC Edizioni scientifiche; 1997.
12. Monesi V, Adamo S, Carinci P, Molinaro M, Siracusa G, Stefanini M, Ziparo E. *Istologia*. Roma: Piccin Nuova Libreria Ed.; 2012.
13. Lindhe J. *Parodontologia clinica e implantologia dentale*. Roma: Ermes Ed; 2010.
14. Oliveira JM, Rodrigues MT, Silva SS, Malafaya PB, Gomes ME, Viegas CA, Dias IR, Azevedo JT, Mano JF, Reis RL. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2006;27(36):6123-37.
15. McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, Taylor M, Wollins J. Residual lateral wall defects following sinus grafting with recombinant human osteogenic protein-1 or Bio-Oss in the chimpanzee. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18(3):227-39.
16. Newman MG, Takey HH, Carranza FA. *Parodontologia clinica 1/2*. Antonio Delfino Editore: Roma; 2011.
17. Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. Trabecular bone microarchitecture: a review. *Morphologie* 2008;92(299):162-70.
18. Krug R, Carballido-Gamio J, Burghardt AJ, Haase S, Sedat JW, Moss WC, Majumdar S. Wavelet-based characterization of vertebral trabecular bone structure from magnetic resonance images at 3 T compared with micro-computed tomographic measurements. *Magn Reson Imaging* 2007;25(3):392-8.
19. Chiapasco M. *Manuale illustrato di chirurgia orale*. Milano: Edra Masson; 2013.

20. Chu TM, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 2007;28(3):459-67.
21. Jeon O, Song SJ, Kang SW, Putnam AJ, Kim BS. Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold. *Biomaterials* 2007;28(17):2763-71.
22. Canullo L, Malagnino VA. Vertical ridge augmentation around implants by e-PTFE titanium-reinforced membrane and bovine bone matrix: a 24- to 54-month study of 10 consecutive cases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23(5):858-66.
23. Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Rohrer MD, Cho SC. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: a clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis- Part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18(6):528-43
24. Keith JD Jr. Localized ridge augmentation with a block allograft followed by secondary implant placement: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004;24(1):11-7.
25. Lyford RH, Mills MP, Knapp CI, Scheyer ET, Mellonig JT. Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23(5):417-25.
26. Wang PD, Klein S, Kaufman E. One-stage maxillary sinus elevation using a bone core containing a preosseointegrated implant from the mandibular symphysis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(5):435-9.
27. Weber HP, Mönkmeyer UR. *Concetti di terapia implanto-protetica. Il trattamento della mascella*. Roma: Antonio Delfino Editore; 2002.
28. Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Paans AM, Ruben JL, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RR. The influence of barrier membranes on autologous bone grafts. *J Dent Res* 2008;87(11):1048-52.
29. Kim TS, Knittel M, Dörfer C, Steinbrenner H, Holle R, Eickholz P. Comparison of two types of synthetic biodegradable barriers for GTR in interproximal infrabony defects: clinical and radiographic 24-month results. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23(5):481-9.
30. Vernino AR, Ringeisen TA, Wang HL, Derhalli M, Rapley J, Nechamkin SJ, Brekke J. Use of biodegradable polylactic acid barrier materials in the treatment of grade II periodontal furcation defects in humans-Part I: A multicenter investigative clinical study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18(6):572-85.
31. Longoni S, Sartori M, Apruzzese D, Baldoni M. Preliminary clinical and histologic evaluation of a bilateral 3-dimensional reconstruction in an atrophic mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implant* 2007;22(3):478-83.
32. Piattelli A, Quaranta M, Calabrese L, Scarano A, Piattelli M. *Atlante di istologia implantare*. Bologna: Edizioni Martina; 1996.
33. Danan M, Degrange M, Vaideanu T, Brion M. Immediate replacement of a maxillary central incisor associated with severe facial bone loss: use of Bio-Oss collagen: case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23(5):491-7.
34. McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, Buck D, Hollinger JO, Lynch SE. Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(3):361-8.
35. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Chungpanich S. Two uncommon uses of Bio-Oss for GTR and ridge augmentation following extractions: two case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(3):279-85

36. Sculean A, Chiantella GC, Windisch P, Gera I, Reich E. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) combined with a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(3):259-67.
37. Tadjodin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 2003 Mar;30(3):261-70.
38. Bedini R, Ioppolo P, Pecci R, Filippini P, Caiazza S, Bianco A, Columbro G. *Osservazioni di osso equino al microscopio elettronico a scansione e alla Microtomografia 3D*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005 (Rapporti ISTISAN 05/37).
39. Quaranta M, Malchiodi L. *Implantologia orale*. Bologna: Edizioni Martina; 2006.
40. Guarnieri R, Bovi M. Maxillary sinus augmentation using prehardened calcium sulfate: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(5):503-8.
41. Tadjodin ES, de Lange GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Burger EH. High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs. autogenous bone for sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 2002;13(4):428-36.
42. Tadjodin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kulper L, Burger EH. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res* 2000;11(4):334-44.
43. de Lange G, Tadjodin E. Fate of the HA coating of loaded implants in the augmented sinus floor: a human case study of retrieved implants. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(3):287-96.
44. Maiorana C, Santoro F. Maxillary and mandibular bone reconstruction with hip grafts and implants using Frialit-2 implants. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(3):221-9.
45. Maragos P, Bissada NF, Wang R, Cole BP. Comparison of three methods using calcium sulfate as a graft/barrier material for the treatment of Class II mandibular molar furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(5):493-501.
46. Costa-Pinto AR, Salgado AJ, Correló VM, Sol P, Bhattacharya M, Charbord P, Reis RL, Neves NM. Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (BMC9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3D porous scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2008;14(6):1049-57.
47. Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, Walder B, Zhang X, Soo C, Ting K, Wu B. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses *in vitro* and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng* 2007;13(3):501-12.
48. Gomes ME, Holtorf HL, Reis RL, Mikos AG. Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Eng* 2006;12(4):801-9.
49. Gomes ME, Sikavitsas VI, Behraves E, Reis RL, Mikos AG. Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2003;67(1):87-95.
50. Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Ann Biomed Eng* 2005;33(9):1238-48.
51. Hofmann S, Hagenmuller H, Koch AM, Muller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, Merkle HP, Meinel L. Control of *in vitro* tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials* 2007;28(6):1152-62.
52. Margolin MD, Cogan AG, Taylor M, Buck D, McAllister TN, Toth C, McAllister BS. Maxillary sinus augmentation in the non-human primate: a comparative radiographic and histologic study between recombinant human osteogenic protein-1 and natural bone mineral. *J Periodontol* 1998;69(8):911-9.

53. Papadimitropoulos A, Mastrogiacomo M, Peyrin F, Molinari E, Komlev VS, Rustichelli F, Cancedda R. Kinetics of *in vivo* bone deposition by bone marrow stromal cells within a resorbable porous calcium phosphate scaffold: an X-ray computed microtomography study. *Biotechnol Bioeng* 2007;98(1):271-81.
54. Huang J, Lin YW, Fu XW, Best SM, Brooks RA, Rushton N, Bonfield W. Development of nano-sized hydroxyapatite reinforced composites for tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(11):2151-7.
55. Jones JR, Poologasundarampillai G, Atwood RC, Bernard D, Lee PD. Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds. *Biomaterials* 2007;28(7):1404-13.
56. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26(27):5474-91.
57. Lin-Gibson S, Cooper JA, Landis FA, Cicerone MT. Systematic investigation of porogen size and content on scaffold morphometric parameters and properties. *Biomacromolecules* 2007;8(5):1511-8.
58. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2004;32(3):477-86.
59. Stauber M, Müller R. Micro-computed tomography: a method for the non-destructive evaluation of the three-dimensional structure of biological specimens. *Methods Mol Biol* 2008; 455:273-92.
60. Eckstein F, Matsuura M, Kuhn V, Priemel M, Muller R, Link TM, Lochmuller EM. Sex differences of human trabecular bone microstructure in aging are site-dependent. *J Bone Miner Res* 2007;22(6):817-24.
61. Cancedda R, Cedola A, Giuliani A, Komlev V, Lagomarsino S, Mastrogiacomo M, Peyrin F, Rustichelli F. Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction. *Biomaterials* 2007;28(15):2505-24.
62. Hangartner TN. Thresholding technique for accurate analysis of density and geometry in QCT, pQCT and microCT images. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007;7(1):9-16.
63. Gielkens PF, Schorringhuis J, de Jong JR, Huysmans MC, Leeuwen MB, Raghoobar GM, Bos RR, Stegenga B. A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Arch Oral Biol* 2008;53(6):558-66.
64. Regauer M, Jürgens P, Budenhofer U, Hartstock M, Böcker W, Bürklein D, Mutschler W, Sader R, Schieker M. Quantitative scanning acoustic microscopy compared to microradiography for assessment of new bone formation. *Bone* 2006;38(4):564-70.
65. Freilich M, Shafer D, Wei M, Kompalli R, Adams D, Kuhn L. Implant system for guiding a new layer of bone. Computed microtomography and histomorphometric analysis in the rabbit mandible. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(2):201-7.
66. Park YS, Yi KY, Lee IS, Jung YC. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(2):156-60. Erratum in: *Clin Oral Implants Res* 2005;16(2):258.
67. Tang SY, Vashishth D. A non-invasive *in vitro* technique for the three-dimensional quantification of microdamage in trabecular bone. *Bone* 2007;40(5):1259-64.
68. Maréchal M, Luyten F, Nijs J, Postnov A, Schepers E, van Steenberghe D. Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(6):708-14.
69. Mulder L, Koolstra JH, den Toonder JM, van Eijden TM. Intratrabecular distribution of tissue stiffness and mineralization in developing trabecular bone. *Bone* 2007 Aug; 41(2):256-65.
70. Willems NM, Mulder L, Langenbach GE, Grunheid T, Zentner A, van Eijden TM. Age-related changes in microarchitecture and mineralization of cancellous bone in the porcine mandibular condyle. *J Struct Biol* 2007;158(3):421-7.

71. Basillais A, Bensamoun S, Chappard C, Brunet-Imbault B, Lemineur G, Ilharreborde B, Ho Ba Tho MC, Benhamou CL. Three-dimensional characterization of cortical bone microstructure by microcomputed tomography: validation with ultrasonic and microscopic measurements. *J Orthop Sci* 2007;12(2):141-8.
72. Bauer JS, Link TM, Burghardt A, Henning TD, Mueller D, Majumdar S, Prevrhal S. Analysis of trabecular bone structure with multidetector computed tomography in a simulated soft-tissue environment. *Calcif Tissue Int* 2007;80(6):366-73.
73. Beaupied H, Chappard C, Basillais A, Lespessailles E, Benhamou CL. Effect of specimen conditioning on the microarchitectural parameters of trabecular bone assessed by micro-computed tomography. *Phys Med Biol* 2006; 51(18):4621-34.
74. Haïat G, Padilla F, Peyrin F, Laugier P. Variation of ultrasonic parameters with microstructure and material properties of trabecular bone: a 3D model simulation. *J Bone Miner Res* 2007; 22(5):665-74.
75. Lu M, Rabie AB. Microarchitecture of rabbit mandibular defects grafted with intramembranous or endochondral bone shown by micro-computed tomography. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41(6):385-91.
76. Perilli E, Baruffaldi F, Visentin M, Bordini B, Traina F, Cappello A, Viceconti M. MicroCT examination of human bone specimens: effects of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters. *J Microsc* 2007; 225(Pt 2):192-200.
77. Claase MB, de Bruijn JD, Grijpma DW, Feijen J. Ectopic bone formation in cell-seeded poly(ethylene oxide)/poly(butylene terephthalate) copolymer scaffolds of varying porosity. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(7):1299-307.
78. Perilli E., Baruffali F., Bisi M.C., Cristofolini L., Cappello A. A physical phantom for the calibration of three-dimensional X-ray microtomography examination. *Journal of Microscopy* 2006;22(2):124-34.
79. Dalle Carbonare L, Giannini S. Histologic diagnosis of metabolic bone diseases: bone histomorphometry. *Reumatismo* 2004;56(1):15-23.
80. Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res* 2005;20(7):1177-84.
81. Cartmell S, Huynh K, Lin A, Nagaraja S, Guldberg R. Quantitative microcomputed tomography analysis of mineralization within three-dimensional scaffolds *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* 2004;69(1):97-104.
82. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002;295(5557):1014-7.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2017, 9° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, dicembre 2017