



RAPPORTI ISTISAN 20|28

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

Corso BIOMAT
Biomateriali, rigenerazione tissutale
e tecnologie innovative per applicazioni
in odontoiatria, ortopedia e chirurgia maxillo-facciale

Roma, Istituto Superiore di Sanità
edizioni 2016-2019

RELAZIONI

A cura di R. Bedini, R. Pecci, D. Meleo, P. Meli, I. Campioni



TECNOLOGIE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Corso BIOMAT Biomateriali, rigenerazione tissutale e tecnologie innovative per applicazioni in odontoiatria, ortopedia e chirurgia maxillo-facciale

Roma, Istituto Superiore di Sanità
edizioni 2016-2019

RELAZIONI

A cura di
Rossella Bedini (a), Raffaella Pecci (a)
Deborah Meleo (b), Paola Meli (a), Ilaria Campioni (c)

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

(b) Libero professionista in odontoiatria, Roma

(c) Ingegnere biomedico, Roma

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

Rapporti ISTISAN
20/28

Istituto Superiore di Sanità

Corso BIOMAT. Biomateriali, rigenerazione tissutale e tecnologie innovative per applicazioni in odontoiatria, ortopedia e chirurgia maxillo-facciale. Roma, Istituto Superiore di Sanità; edizioni 2016-2019. Relazioni.

A cura di Rossella Bedini, Raffaella Pecci, Deborah Meleo, Paola Meli, Ilaria Campioni
2020, vi, 178 p. Rapporti ISTISAN 20/28

In questo rapporto sono raccolte le lezioni che sono state svolte nelle ultime quattro edizioni del corso di biomateriali "BIOMAT" presso l'Istituto Superiore di Sanità, su argomenti riguardanti i biomateriali, la rigenerazione tissutale, le tecnologie innovative, i dispositivi medici impiantabili e non, principalmente per applicazioni in odontostomatologia, in ortopedia e chirurgia maxillofacciale. Il rapporto è strutturato in cinque sezioni. La prima sezione espone il quadro regolatorio e gli aspetti etici relativi al settore dei biomateriali. La seconda sezione è dedicata alla ricerca di base sui biomateriali e le metodiche di rigenerazione tissutale. Nelle ultime tre sezioni, sono riportate le lezioni riguardanti le tecnologie innovative, le metodiche e le principali applicazioni rispettivamente in odontostomatologia, ortopedia e chirurgia maxillofacciale.

Parole chiave: Biomateriali; Rigenerazione tissutale; Dispositivi medici; Tecnologie innovative; Applicazioni cliniche; Linee guida; Odontostomatologia; Ortopedia; Chirurgia maxillofacciale

Istituto Superiore di Sanità

BIOMAT Course. Biomaterials, tissue regeneration and innovative technologies for applications in dentistry, orthopedics and maxillofacial surgery. Rome, Istituto Superiore di Sanità; 2016-2019 editions. Lectures.

Edited by Rossella Bedini, Raffaella Pecci, Deborah Meleo, Paola Meli, Ilaria Campioni
2020, vi, 178 p. Rapporti ISTISAN 20/28 (in Italian)

This report collects the lessons carried out in the last four editions of the biomaterials course BIOMAT at the Istituto Superiore di Sanità, on topics concerning biomaterials, tissue regeneration, innovative technologies, implantable medical devices and not, mainly for applications in odontostomatology, orthopaedics and maxillofacial surgery. The report is structured into five sections. The first section presents the regulatory framework and ethical aspects relating to the biomaterials sector. The second section is dedicated to basic research on biomaterials and tissue regeneration methods. In the last three sections, the lessons regarding innovative technologies, methods and main applications are reported respectively in odontostomatology, orthopaedics and maxillofacial surgery.

Key words: Biomaterials; Tissue regeneration; Medical devices; Innovative technologies; Clinical applications; Guidelines; Odontostomatology; Orthopedics; Maxillofacial surgery

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, Meleo D, Meli P, Campioni I (Ed.). *Corso BIOMAT. Biomateriali, rigenerazione tissutale e tecnologie innovative per applicazioni in odontoiatria, ortopedia e chirurgia maxillo-facciale. Roma, Istituto Superiore di Sanità; edizioni 2016-2019. Relazioni.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporti ISTISAN 20/28).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*
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: *Sandra Salinetti e Manuela Zazzara*

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



INDICE

Presentazione	v
----------------------------	---

Sezione 1

Biomateriali, rigenerazione tissutale e tecnologie innovative: legislazioni, linee guida e aspetti etici

Dispositivi per rigenerazione tissutale: la sperimentazione clinica nel quadro normativo e regolatorio <i>Carla Daniele</i>	3
Tecnologie innovative e dispositivi medici: la sperimentazione clinica nel nuovo regolamento europeo <i>Carla Daniele</i>	9
Normativa europea sulla sperimentazione animale: tutela ed etica migliorate <i>Paola Meli</i>	15
Ministero della Salute: raccomandazioni cliniche in materia di implantologia orale <i>Michele Nardone</i>	17
Materiali dentali tra norme, giurisprudenza e pubblicità <i>Maria Sofia Rini</i>	23
È possibile discostarsi dalle linee guida? <i>Maria Sofia Rini</i>	26
Tecnologie innovative e l'etica <i>Paola Meli</i>	34
Tecnologie innovative e pratica quotidiana: aspetti etici e medico legali <i>Maria Sofia Rini</i>	36

Sezione 2

Biomateriali e rigenerazione tissutale: ricerca di base

Biomateriali innovativi, biocompatibili e biomimetici in medicina rigenerativa del tessuto osseo <i>Marco Tatullo</i>	43
Idrogeli a base peptidica: nuovi biomateriali per l'ingegneria tissutale <i>Laura Chronopoulou</i>	49
Peptidi auto-assemblanti per la rigenerazione tissutale <i>Laura Chronopoulou</i>	54
Drug delivery e incapsulamento cellulare: materiali, dispositivi, meccanismi di rilascio e interazione con le cellule <i>Ilaria Cacciotti</i>	56
Biomateriali per sistemi per il drug delivery nel trattamento topico di malattie locali del cavo orale <i>Giuseppina Nocca</i>	66

Caratterizzazione biochimica della cellula staminale: staminalità, metabolismo e interazione con i biomateriali	
<i>Giuseppina Nocca</i>	71
Nanomateriali e cellule staminali per la rigenerazione dei tessuti dentali	
<i>Giovanna Orsini</i>	77

Sezione 3

Biomateriali, rigenerazione tissutale e tecnologie innovative in odontostomatologia

Rigenerazione tissutale mediata da fattori biologici e biofisici	
<i>Massimo Corigliano</i>	83
Procedure di rigenerazione ossea: biomateriali a confronto nel grande rialzo di seno mascellare	
<i>Antonio Scarano</i>	89
Nuove prospettive nella rigenerazione guidata dell'osso con dispositivi barriera in titanio customizzati	
<i>Mirko Andreasi Bassi</i>	96
Rigenerazione ossea guidata con dispositivi barriera in titanio customizzabili ed evoluzione del concetto di <i>Open Barrier Membrane Technique</i>	
<i>Mirko Andreasi Bassi</i>	100
Valutazione <i>in vitro</i> dell'efficacia di un nuovo coating per impianti endo-ossei	
<i>Francesco Carinci</i>	105
Sperimentazione su modello animale di sostituti ossei in medicina traslazionale	
<i>Aurelio Muttini</i>	107
Sperimentazione clinica di diverse tipologie di sostituti ossei	
<i>Deborah Meleo</i>	109
Ruolo dell'osso eterologo cortico-spongioso in colture di cellule staminali del legamento parodontale umano: uno studio di microtomografia a contrasto di fase basato sulla radiazione di sincrotrone	
<i>Alessandra Giuliani</i>	116
Pianificazione 3D negli interventi di chirurgia rigenerativa: vantaggi clinici ed ergonomici	
<i>Michele Lopez</i>	124
Tecnologie innovative al servizio della semplificazione delle riabilitazioni implantoprotesiche: implantologia computer-assistita	
<i>Deborah Meleo</i>	126
Fotobiomodulazione in odontoiatria e medicina	
<i>Morena Petrini</i>	128

Sezione 4

Biomateriali, rigenerazione tissutale e tecnologie innovative in ortopedia

Sostituzione del tessuto osseo: dalla ricerca di base alla pratica clinica	133
<i>Giandomenico Logroscino</i>	133

Rigenerazione del disco intervertebrale mediata dalle cellule staminali mesenchimali <i>Gianluca Vadalà, Vincenzo Denaro</i>	138
Osservazioni microtomografiche di rigenerazione tissutale in odontoiatria e in ortopedia <i>Raffaella Pecci</i>	145
Studio dell'interazione tra tessuto e biomateriale con tecniche fisiche avanzate basate sull'utilizzo della radiazione di sincrotrone: applicazioni in ortopedia e odontoiatria <i>Alessandra Giuliani</i>	152

Sezione 5

Biomateriali, rigenerazione tissutale e tecnologie innovative in chirurgia maxillofacciale

Dispositivi per applicazioni in chirurgia maxillofacciale: dalla progettazione alla realizzazione dei prototipi mediante manifattura additiva e valutazione della qualità <i>Ilaria Campioni</i>	163
Tomografia di sincrotrone basata sul phase-contrast: un metodo emergente per l'imaging della microvascolarizzazione nell'osso ingegnerizzato dei distretti cranio facciali <i>Alessandra Giuliani</i>	166
Prodotti custom-made realizzati con processi innovativi in chirurgia rigenerativa e ricostruttiva della regione maxillo-facciale <i>Marco Tatullo</i>	173

PRESENTAZIONE

L'impiego dei biomateriali e in particolare il ricorso a metodiche di rigenerazione tissutale in odontostomatologia, in ortopedia e in chirurgia maxillofacciale ha mostrato negli ultimi anni un crescente interesse sia nei settori propri della ricerca scientifica che negli ambiti clinici per il grande potenziale in termini applicativi.

Il ricorso alle cure presso le strutture del Servizio Sanitario Nazionale (SSN), non soltanto per le terapie più semplici, ma anche per quelle più complesse e che utilizzano le metodiche di rigenerazione tissutale, è infatti in crescente aumento.

È emersa pertanto la necessità da parte dei sistemi sanitari nazionali di seguire l'evoluzione del settore per poter garantire l'efficacia e la sicurezza delle prestazioni sanitarie nel rispetto della tutela della salute del cittadino.

Per soddisfare e raggiungere tale obiettivo è di primaria importanza fornire agli operatori coinvolti gli elementi utili ad adeguare e a mantenere aggiornata la loro formazione.

Il corso di biomateriali (BIOMAT) nell'ambito delle attività del Centro Nazionale di Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica (TISP) presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ha consentito di esplicitare tale attività formativa affrontando alcuni aspetti fondamentali: gli aspetti etici; il recepimento e applicazione delle normative europee e nazionali specifiche e inerenti alla sperimentazione, all'applicazione dei biomateriali, alle metodiche di rigenerazione tissutale e alle relative tecnologie innovative; gli aspetti più teorici, i biomateriali e la loro caratterizzazione; i casi applicativi e i risultati delle sperimentazioni in laboratorio sia *in vitro* sia *in vivo* e delle sperimentazioni cliniche.

Pertanto, i principali obiettivi del corso BIOMAT sono stati i seguenti:

- Migliorare la conoscenza sulla disponibilità di biomateriali e tecnologie di rigenerazione tissutale e strumentazione inerente.
- Migliorare la conoscenza delle metodiche per l'utilizzo di biomateriali e dispositivi per la rigenerazione tissutale e strumentazione inerente.
- Incrementare la conoscenza sulle nuove possibilità d'intervento della rigenerazione tissutale nelle strutture dell'SSN.
- Acquisire strumenti per la valutazione costo-efficacia degli interventi e della disponibilità di biomateriali, metodiche e tecnologie innovative per la rigenerazione tissutale e strumentazione inerente.

Le edizioni del corso BIOMAT sono state svolte nell'ambito dell'accordo di collaborazione scientifica tra ISS e Università degli Studi di Teramo, Università degli Studi Campus Biomedico di Roma, Università degli Studi G. D'Annunzio di Chieti e Pescara, denominato *Forum On Regenerative Methods* approvato dal Consiglio di Amministrazione (CdA) dell'ISS con Delibera n. 5, verbale n. 8 del 6 settembre 2016.

Il presente rapporto include una raccolta delle lezioni che sono state svolte nelle ultime quattro edizioni del corso BIOMAT presso l'ISS, dal 2016 al 2019, su argomenti riguardanti i biomateriali, la rigenerazione tissutale, le tecnologie innovative, i dispositivi medici impiantabili e non, principalmente per applicazioni in odontostomatologia, in ortopedia e chirurgia maxillofacciale.

È suddiviso in cinque sezioni tematiche.

La prima sezione espone il quadro regolatorio e gli aspetti etici relativi al settore dei biomateriali.

La seconda sezione è dedicata alla ricerca di base sui biomateriali e le metodiche di rigenerazione tissutale.

Nelle ultime tre sezioni, sono riportate le lezioni riguardanti le tecnologie innovative, le metodiche e le principali applicazioni rispettivamente in odontostomatologia, ortopedia e chirurgia maxillofaciale.

I curatori

SEZIONE 1
Biomateriali, rigenerazione tissutale
e tecnologie innovative: legislazioni,
linee guida e aspetti etici

DISPOSITIVI PER RIGENERAZIONE TISSUTALE: LA SPERIMENTAZIONE CLINICA NEL QUADRO NORMATIVO E REGOLATORIO

Carla Daniele

Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I tessuti

Il corpo umano è caratterizzato da quattro tipi di tessuto: epiteliale, connettivo, muscolare e nervoso. Soprattutto nel settore dell'ortopedia e della odontoiatria, quando parliamo di tessuto, pensiamo subito al tessuto osseo che è una forma specializzata di tessuto connettivo.

Ciò che contraddistingue il tessuto osseo dal tessuto connettivo propriamente detto è la mineralizzazione della matrice extracellulare che conferisce al tessuto notevole durezza e resistenza. Il tessuto osseo è un tessuto attivo dove vi è un bilanciamento tra l'attività di riassorbimento dell'osso esistente e la deposizione di nuovo osso. Nonostante tali caratteristiche, l'osso nel suo complesso è leggero; ciò è dovuto alla sua organizzazione strutturale caratterizzata dalla compresenza di tessuto osseo compatto e tessuto osseo spugnoso.

Tale straordinaria organizzazione interna conferisce alle ossa la proprietà di massima resistenza associata al minimo peso; ciò rappresenta uno degli attributi più importanti del tessuto. Il tessuto osseo inoltre non è un tessuto statico ma è un tessuto vivo, continuamente rinnovato e rimodellato al fine di assolvere alle sue funzioni meccaniche e al compito di regolazione della concentrazione di calcio nel plasma (omeostasi ciclica).

Tuttavia numerose sono le situazioni nelle quali la riparazione ossea non si verifica o si attua in tempi molto lunghi; basta pensare al caso di fratture o malformazioni congenite o osteoporosi. La rigenerazione ossea, nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, ha lo scopo di sollecitare il processo fisiologico di riparazione dell'osso e prevede l'impiego di biomateriali, ossia di *scaffold* come impalcature di supporto.

Uno "*scaffold*-biomateriale" è un materiale progettato per interagire con i sistemi biologici e provocare una risposta biologica dell'organismo in cui si trova a operare e deve essere biocompatibile, ossia deve essere ben tollerato dall'organismo ospite, determinando una risposta opportuna in relazione all'applicazione da parte di quest'ultimo.

Ovviamente ogni tipo di biomateriale ha delle proprie caratteristiche in funzione della sua natura chimica (metallici, polimerici, ceramici, compositi, biologici) presentando dei vantaggi e degli svantaggi relativi al suo utilizzo che ne permettono delle differenti applicazioni nel settore biomedico.

I biomateriali sintetici e quelli costituiti da tessuti di origine animale, opportunamente trattati, ossia resi non vitali, sono dispositivi medici e ricadono nel campo di applicazione della Direttiva 93/42/CEE (1).

Valutazione clinica dei dispositivi medici ai fini della marcatura CE

I dispositivi medici sono suddivisi in classi di rischio sulla base del rischio che deriva dal loro utilizzo. La classificazione si basa sulla destinazione d'uso, durata di utilizzo, modalità di funzionamento, organo in cui il dispositivo esercita la sua funzione. I dispositivi medici per rigenerazione ossea sono dispositivi impiantabili e molti di essi sono realizzati con tessuto di origine animale, pertanto hanno una elevata classe di rischio, classe III.

Prima di essere commercializzati e utilizzati su molti pazienti, deve essere verificata la conformità del dispositivo medico ai Requisiti Essenziali della Direttiva Comunitaria. Pertanto il soddisfacimento di tali Requisiti costituisce la condizione necessaria e sufficiente per l'immissione in commercio del prodotto in quanto i Requisiti Essenziali permettono di ritenere ottenuta la sicurezza e l'efficacia del dispositivo stesso. La dimostrazione della conformità ai Requisiti Essenziali deve comprendere una valutazione clinica in quanto il dispositivo medico deve essere fabbricato in modo che la sua utilizzazione, nelle condizioni e negli usi previsti, non deve compromettere lo stato clinico o la sicurezza dei pazienti. Inoltre, gli eventuali rischi associati all'uso previsto, devono essere di livello accettabile in rapporto ai benefici apportati al paziente e compatibili con un elevato livello di protezione della salute e della sicurezza (requisito generale di sicurezza). Il dispositivo medico deve, però, fornire le prestazioni di prevenzione, diagnosi, terapia, controllo di una patologia, previste dal fabbricante (requisito generale di efficienza/efficacia).

La valutazione clinica è quindi una metodologia sistematica per la conferma dei requisiti clinici previsti per i dispositivi nelle loro normali condizioni di utilizzo e per la valutazione degli effetti collaterali e dell'accettabilità del rapporto rischi/benefici. Essa deve seguire una procedura definita e metodologicamente valida e si deve basare su dati clinici che possono provenire dalle seguenti fonti: indagini cliniche relative al dispositivo in questione, indagini cliniche o altri studi pubblicati nella letteratura scientifica e relativi a un dispositivo analogo di cui è dimostrabile l'equivalenza al dispositivo in questione.

Indagine clinica con un dispositivo medico

L'indagine clinica con un dispositivo medico è qualsiasi studio sistematico progettato e pianificato in soggetti umani intrapreso per verificare la sicurezza e/o le prestazioni del dispositivo stesso. Si rende spesso necessaria un'indagine clinica appositamente progettata in quanto non sempre la sicurezza e le prestazioni di un dispositivo possono essere adeguatamente dimostrate con i dati forniti dalla letteratura scientifica già esistente o con altri mezzi. D'altra parte, per i dispositivi di classe III e impiantabili, le Direttive prevedono che siano di norma eseguite indagini cliniche.

La Direttive Comunitarie e i decreti di recepimento italiani, relativi ai dispositivi medici ci forniscono la definizione di "Dispositivi per indagini cliniche" ossia un dispositivo medico o medico impiantabile attivo destinato a essere messo a disposizione di un medico debitamente qualificato per lo svolgimento di indagini da effettuarsi in un ambiente clinico umano adeguato.

Esistono delle strutture idonee a svolgere le indagini cliniche e sia il Decreto Ministeriale 12 marzo 2013 che il Decreto Ministeriale 25 giugno 2014 (2, 3) rappresentano una evoluzione rispetto alla precedente situazione che prevedeva l'idoneità delle strutture sanitarie esclusivamente sulla base della loro natura giuridica. È stato introdotto, infatti, il principio secondo cui tutte le strutture sanitarie, pubbliche e private accreditate con il Servizio Sanitario

Nazionale, possono essere sede di indagini cliniche se, con specifico riferimento alla tipologia e classe di rischio del dispositivo da sperimentare, soddisfano i seguenti requisiti: documentata competenza in materia di studi clinici controllati con esperienza nell'ambito specifico della sperimentazione, supportata da pubblicazioni scientifiche ovvero brevetti o altra evidenza di analogo livello; utilizzo consolidato e documentato nella normale pratica clinica presso la struttura ove si svolge la sperimentazione di dispositivi medici della stessa tipologia e classe di rischio del dispositivo da sperimentare.

L'obiettivo dell'indagine clinica è, quindi, la verifica della conformità delle prestazioni del dispositivo medico ai requisiti assegnati dal fabbricante, la individuazione degli eventuali effetti secondari indesiderati, la valutazione dell'accettabilità dei rischi rispetto alle prestazioni assegnate al dispositivo. Tale valutazione deve includere l'accettabilità del rapporto rischi/benefici.

Le indagini cliniche investono molto attori: fabbricante, sponsor, mandatario, procuratore speciale, ricercatori, medici, operatori sanitari, comitati etici, Ministero della Salute, pazienti.

Anche se ultimi nell'elenco i pazienti sono gli "attori" principali ed è per questo che è assolutamente indispensabile che tutte le disposizioni riguardanti la protezione della salute umana siano attuate nello spirito della dichiarazione di Helsinki (4) per ogni fase delle indagini cliniche, dalla prima riflessione sulla necessità e sulla giustificazione dello studio fino alla pubblicazione finale dei risultati.

Lo studio clinico deve essere svolto secondo un opportuno piano di prova. Questo piano di prova deve riflettere le ultime conoscenze tecniche e scientifiche, deve essere definito in modo da confermare o rifiutare le affermazioni del fabbricante, deve comprendere un numero di osservazioni sufficienti per garantire la validità scientifica delle conclusioni. Pertanto è necessario che le procedure utilizzate per le indagini cliniche siano adeguate al dispositivo in esame, siano svolte in condizioni simili a quelle di normale utilizzazione del dispositivo e siano effettuate sotto la responsabilità di un medico specialista o di altra persona in possesso delle necessarie qualifiche.

Prima di avviare una indagine clinica in Italia, il fabbricante/sponsor, deve informare l'Autorità Competente (Ministero della Salute) con un'apposita notifica, la quale deve contenere gli elementi necessari per la valutazione dell'indagine, fra i quali il parere del Comitato Etico del centro clinico coinvolto, ovvero dichiarazione di avvenuta richiesta di parere. Da un punto di vista regolatorio, per i dispositivi appartenenti alla classe III e per i dispositivi impiantabili e per quelli invasivi a lungo termine appartenenti alle classi IIa o IIb, il fabbricante può iniziare le pertinenti indagini cliniche trascorsi sessanta giorni dalla data della notifica, a meno che l'Autorità Competente non gli abbia comunicato, entro tale termine, una decisione in senso contrario, motivata da considerazioni di sanità pubblica o di ordine pubblico.

Normativa UNI EN ISO 14155:2012

Va considerato che, per la conduzione delle indagini cliniche con i dispositivi medici, le norme tecniche armonizzate rappresentano uno standard internazionale di etica e qualità scientifica per progettare, condurre, registrare e relazionare gli studi clinici; la loro osservanza presuppone la rispondenza ai Requisiti Essenziali.

La norma tecnica UNI EN ISO 14155:2012 "Indagini cliniche dei dispositivi medici condotte su soggetti umani – Buona pratica clinica" (5), rappresenta il codice di buona pratica clinica e costituisce uno strumento essenziale per tutti gli attori coinvolti. La normativa descrive le procedure e le metodologie di riferimento di uno studio clinico, dalla pianificazione fino alla chiusura dell'indagine clinica. La finalità della norma è quella di dettare i requisiti generali per la protezione dei diritti, della sicurezza e del benessere dei soggetti umani coinvolti, di assicurare la

conduzione scientifica a dell'indagine clinica definendone le responsabilità di sponsor, fabbricanti, sperimentatori, comitati etici, organismi notificati.

In tale norma vengono tra l'altro approfonditi gli aspetti etici relativi alla sperimentazione clinica e sono riportati nelle Appendici i contenuti dei documenti essenziali per la pianificazione di una indagine clinica come, per esempio, il protocollo clinico e il dossier per lo sperimentatore. Sono indicate, inoltre, le procedure di conclusione, sospensione interruzione dell'indagine.

Il protocollo clinico è il documento redatto dallo sponsor e definisce l'obiettivo, la progettazione, la metodologia, le considerazioni statistiche e l'organizzazione dello studio. Fornisce anche il razionale dello studio clinico. Esso contiene le Informazioni generali di identificazione dell'indagine clinica (sponsor, responsabile scientifico, sperimentatori coinvolti, centri coinvolti); le informazioni sul dispositivo medico; il razionale dell'indagine clinica; gli obiettivi dello studio clinico; i rischi e benefici; le considerazioni etiche; le prove precliniche e l'esperienza clinica precedente; la descrizione dello studio clinico da eseguire (mono/multicentrico, controllato/non controllato ecc.); la numerosità del campione; i criteri di inclusione ed esclusione clinica; la descrizione del periodo di arruolamento, il trattamento, il follow-up ed criteri per la sospensione dello studio; la registrazione e analisi degli eventi indesiderati ed gli esiti; gli eventuali fattori che possono compromettere esiti e l'interpretazione dei risultati.

Il dossier per lo sperimentatore contiene gli elementi necessari ai fini della valutazione del dispositivo medico. Per questo è necessario che vi sia una valutazione che supporti il razionale per l'uso previsto del dispositivo e la progettazione dell'indagine clinica, la descrizione generale del dispositivo, dei suoi componenti e dei materiali utilizzati nonché del meccanismo di azione, le istruzioni del fabbricante per l'uso e l'installazione, l'analisi e valutazione dei rischi, gli studi preclinici ossia i risultati dei dati *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* pertinenti al dispositivo, compresi gli studi animali, l'eventuale esperienza clinica precedente relativa al dispositivo e altri dispositivi simili, un elenco di norme applicate.

Per quanto concerne l'analisi e la valutazione dei rischi, la normativa UNI EN ISO 14155:2012 contiene il riferimento alla UNI CEI EN ISO 14971:2012 "Dispositivi medici – Applicazione della gestione dei rischi ai dispositivi medici" (6) la cui osservanza è il prerequisito essenziale per avviare l'indagine clinica, al fine di ridurre la probabilità che si verifichi un evento negativo durante l'utilizzo del dispositivo medico (resta comunque che si possano utilizzare metodi alternativi, sempre nel rispetto dello stesso livello di efficacia).

Tale normativa consente, individuato l'uso previsto del dispositivo, di identificare i pericoli che il fabbricante ha individuato con l'utilizzo del dispositivo, come abbia stimato, valutato e controllato i rischi e l'efficacia di tale controllo. L'analisi dei rischi deve contenere:

- *analisi del rischio*: identificazione dell'uso previsto/scopo previsto (fase 1), identificazione del pericolo (fase 2) stima del rischio (fase 3);
- *valutazione del rischio*: decisioni sull'accettabilità del rischio (fase 4);
- *controllo del rischio*: analisi delle opzioni, implementazione, valutazione del rischio residuo, accettazione complessiva del rischio;
- *informazioni post-produzione*: esperienza post-produzione, revisione dell'esperienza di gestione del rischio.

Nell'analisi dei rischi è importante l'identificazione delle PCD (Possibili Cause di Danno) la determinazione della Probabilità (P) che la singola PCD produca il danno corrispondente, la determinazione della Gravità del Danno (G). Le probabilità possono essere stimate elaborando le informazioni provenienti da letteratura tecnica, studi clinici per dispositivi simili, esperienza del fabbricante. Anche la gravità del danno associato a un rischio può essere ricavata dalla letteratura o norme vigenti.

Combinando insieme le probabilità e la gravità del danno è possibile definire una tabella di criticità del rischio dove possono essere individuate tre zone: zona di rischio accettabile, zona di rischio ALARP (*As Low As Reasonably Practicable*), zona di rischio intollerabile.

La zona di rischio accettabile è la zona di rischio trascurabile rispetto al rischio relativo ad altri pericoli che vengono accettati. In questo caso non è necessario ricercare una soluzione per ridurre il rischio. La zona compresa tra la fascia di rischio inaccettabile e quella accettabile viene denominata zona di rischio ALARP. In questa zona i rischi vanno ridotti al livello minimo possibile, tenendo presenti il rapporto tra i benefici connessi con l'accettazione del rischio e il costo di una ulteriore riduzione. Il rischio va quindi ridotto al livello in cui risulti "il più basso di quanto ragionevolmente possibile". La zona di rischio intollerabile è la zona in cui il rischio è talmente elevato che non può essere tollerato, è indispensabile una riduzione del rischio da attuare tramite la riduzione della probabilità e/o della gravità relative.

Notifica di indagine clinica

L'indagine clinica deve essere notificata alle Autorità Competenti (in Italia il Ministero della Salute) insieme agli elementi necessari per la valutazione. Le modalità di presentazione della notifica dell'indagine clinica sono contenute all'interno del Decreto Ministeriale del 2 agosto 2005, della Circolare Ministeriale del 2 agosto 2011 e del Decreto Ministeriale del 25 giugno 2014 (3, 7, 8).

Gli studi vanno presentati ai Comitati Etici competenti per territorio, che hanno il compito di valutare, in modo autonomo e indipendente, lo studio proposto.

Qualora il Ministero della Salute intenda adottare un provvedimento di diniego motivato allo svolgimento di indagine clinica, invita il fabbricante o il mandatario a presentare le proprie controdeduzioni.

Valutazione clinica post-commercializzazione

Fino a ora si è fatto riferimento alle indagini cliniche pre-commercializzazione (*pre-market*), ossia alle indagini cliniche di dispositivi non marcati CE.

Possono essere effettuate indagini cliniche con dispositivi medici marcati CE, non modificati nelle caratteristiche e impiegati per la stessa destinazione d'uso oggetto della procedura di valutazione della conformità preliminare alla marcatura e utilizzati secondo le istruzioni d'uso (*Instructions For Use*, IFU) redatte dal fabbricante. In questo caso si parla di valutazione clinica post-commercializzazione o *post-market-clinical follow-up*. Infatti la valutazione clinica svolta dal fabbricante, iniziata nella fase di pre-commercializzazione, non finisce con la commercializzazione del dispositivo, ma continua dopo la marcatura CE per la conferma della sicurezza e delle prestazioni del dispositivo, dell'accettabilità del rapporto rischio/beneficio e della identificazione di eventuali ulteriori rischi che possono emergere dall'impiego del prodotto su ampia scala e a lungo termine. Queste indagini cliniche sono definite come indagini *post-market*. Nel caso di svolgimento di indagini cliniche *post-market*, la normativa prevede, oltre al parere favorevole del Comitato Etico di riferimento, una sola comunicazione al Ministero della Salute. Esiste una linea guida europea per la conduzione del follow-up clinico nel *post-market*.

Indagini cliniche non finalizzate alla commercializzazione

Le indagini cliniche possono anche essere condotte con dispositivi non marcati CE per motivi di ricerca e studio, e non per scopi commerciali. Si parla in questo caso di indagini cliniche “no profit”.

Questi studi non sono disciplinati dalle Direttive europee. Tuttavia, in Italia, come negli altri Stati Membri europei anche nei casi in cui non si evidenzia un obiettivo commerciale, tali indagini vengono valutate in base agli stessi principi utilizzati per le indagini commerciali. Il Ministero della Salute, per la tutela della salute dei pazienti, applica le stesse procedure previste per le indagini cliniche finalizzate alla marcatura CE. In tal caso lo sponsor (Università, Ospedali, Enti di Ricerca, ecc.) assume le funzioni e le responsabilità previste dalle direttive europee per il fabbricante.

Bibliografia

1. Italia. Decreto Legislativo 46 del 24 febbraio 1997. Attuazione della direttiva 93/42/CEE, concernente i dispositivi medici. *Gazzetta Ufficiale* 54 *Supplemento Ordinario* 49 del 6 marzo 1997.
2. Italia. Ministero della Salute. Decreto 12 marzo 2013. Limiti, condizioni e strutture presso cui è possibile effettuare indagini cliniche di dispositivi medici, ai sensi dell'articolo 14 del Decreto Legislativo 46 del 24 febbraio 1997 e successive modificazioni. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 111 del 14 maggio 2013.
3. Italia. Ministero della Salute. Decreto 25 giugno 2014. Modalità, procedure e condizioni per lo svolgimento delle indagini cliniche con dispositivi medici impiantabili attivi ai sensi dell'articolo 7, comma 6, del Decreto Legislativo 507 del 14 dicembre 1992 e successive modificazioni. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 218 del 19 settembre 2014.
4. World Medical Association (WMA). *Ethical principles for medical research involving human subjects*. Helsinki; 1964. Disponibile all'indirizzo: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>; ultima consultazione 26/03/18
5. UNI EN ISO 14155. *Indagine clinica dei dispositivi medici per soggetti umani – Buona pratica clinica*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2012.
6. UNI CEI EN ISO 14971. *Dispositivi medici: applicazione della gestione del rischio ai dispositivi medici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2009.
7. Italia. Ministero della Salute. Decreto 2 agosto 2005. Modalità di presentazione della documentazione per notifica di indagine clinica con dispositivi medici. *Gazzetta Ufficiale* 210 del 9 settembre 2005.
8. Italia. Ministero della Salute. Circolare 2 agosto 2011. Chiarimenti sulle modalità di presentazione della documentazione per notifica di indagine clinica con dispositivi medici. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 191 del 18 agosto 2011.

TECNOLOGIE INNOVATIVE E DISPOSITIVI MEDICI: LA SPERIMENTAZIONE CLINICA NEL NUOVO REGOLAMENTO EUROPEO

Carla Daniele

Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Tecnologie innovative

Nel settore dell'odontoiatria, della chirurgia maxillo-facciale e dell'ortopedia si fa sempre più ricorso a tecnologie innovative di cui grande importanza rivestono i biomateriali (1) che sono materiali che si interfacciano con i sistemi biologici per valutare, trattare, aumentare o sostituire un qualunque tessuto, organo o funzione dell'organismo provocando una risposta biologica dell'organismo in cui si trovano a operare. Ogni tipo di biomateriale ha delle proprie caratteristiche che ne permette delle differenti applicazioni nel settore biomedico.

In base alla loro origine e provenienza possono essere suddivisi in due grandi gruppi: biologici o sintetici. Tra i sintetici, grande importanza per questo settore sono i materiali biorisorbibili polimerici tra cui l'acido poliglicolico (*Polyglycolic Acid*, PGA), l'acido polilattico (*Polylactic Acid*, PLA), il policaprolattone (*Polycaprolactone*, PCL) mentre tra i biologici abbiamo gli eterologhi, realizzati con tessuto animale reso non vitale prelevato da animali (bovini, suini, equini) ossia da specie diversa da quella del ricevente.

I biomateriali soprattutto quelli di tipo sintetico, possono essere utilizzati come impalcature di supporto ossia *scaffold* per la rigenerazione cellulare.

Soprattutto nel settore dell'ortopedia e della odontoiatria, quando parliamo di tessuto, pensiamo subito al tessuto osseo che è una forma specializzata di tessuto connettivo. Molti biomateriali utilizzati in questo settore sono dispositivi medici, basti pensare alla rigenerazione ossea e ai sostituti sintetici dell'osso.

Infatti sono numerose le situazioni nelle quali la riparazione ossea non si verifica o si attua in tempi molto lunghi e la rigenerazione ossea, nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, ha lo scopo di sollecitare il processo fisiologico di riparazione dell'osso mediante l'utilizzo di biomateriali.

Uno "*scaffold*-biomateriale" è, quindi, un materiale progettato per interagire con i sistemi biologici e provocare una risposta biologica dell'organismo in cui si trova a operare e deve essere biocompatibile, ossia deve essere ben tollerato dall'organismo ospite, determinando una risposta opportuna in relazione all'applicazione da parte di quest'ultimo.

Ovviamente ogni tipo di biomateriale ha delle proprie caratteristiche in funzione della sua natura chimica (metallici, polimerici, ceramici, composti, biologici) presentando dei vantaggi e degli svantaggi relativi al suo utilizzo che ne permettono delle differenti applicazioni nel settore biomedico.

I biomateriali sintetici e quelli costituiti da tessuti di origine animale, opportunamente trattati, ossia resi non vitali, sono dispositivi medici e ricadevano nel campo di applicazione della direttiva 93/42/CEE e relativo Decreto Legislativo di recepimento (2).

Regolamento (UE) 2017/745

Nel panorama regolatorio europeo dei dispositivi medici c'è stata una evoluzione con il Regolamento (UE) 2017/745 (noto come MDR, *Medical Device Regulation*) del Parlamento Europeo e del Consiglio del 5 aprile 2017 (3).

Tutto è iniziato da una proposta legislativa della Commissione Europea del 26 settembre 2012 che ha visto un dialogo tra il Parlamento Europeo, la Commissione Europea e il Consiglio dell'Unione Europea (UE).

Il Regolamento (UE) 2017/745 è stato pubblicato sulla *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* il 5 maggio 2017 ed è entrato in vigore il 25 maggio 2017, il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea*.

Tale regolamento prevede l'abrogazione della Direttiva 93/42/CEE (dispositivi medici) e della Direttiva 90/385/CEE (dispositivi medici impiantabili attivi) a decorrere dal 26 maggio 2020, in cui ci sarà la completa applicazione del regolamento.

Mettendo a confronto il Regolamento (UE) 2017/745 con la Direttiva 93/42/CEE, si rileva che se quest'ultima prevedeva 22 considerando, 13 definizioni, 22 articoli e 12 allegati, l'MDR prevede 101 considerando, 71 definizioni, 10 capi, 123 articoli, 17 allegati. Inoltre, il regolamento non ha bisogno di essere recepito poiché è lo stesso per tutti gli Stati Membri dell'UE, oltre a essere unico per i dispositivi medici e i dispositivi medici impiantabili attivi.

Principali novità

L'MDR ha introdotto delle importanti novità. Il regolamento presenta maggiori certezze legali è, infatti, uno strumento regolatorio unico per tutti gli Stati Membri dove sono forniti chiarimenti sull'ambito di applicazione, rafforzando il ruolo della Commissione Europea nelle decisioni sullo stato regolatorio dei prodotti e l'introduzione del Gruppo di Coordinamento per i Dispositivi Medici (*Medical Device Coordination Group*, MDCG), costituito da un membro e da un supplente per ciascun Stato Membro, per un mandato di tre anni rinnovabile, competenti nel settore dei dispositivi medici.

Il regolamento presenta anche una apertura all'innovazione: vi sono nuove regole dedicate al software e ai nanomateriali e maggiore trasparenza e attenzione dei pazienti con la creazione di una banca dati europea dei dispositivi medici (*European Databank For Medical Devices*, EUDAMED) con gran parte delle informazioni rese disponibili al pubblico e l'introduzione di una tessera per i pazienti portatori di impianti contenenti le informazioni riguardanti i dispositivi medici impiantabili.

Nel regolamento sono stati inclusi dispositivi con scopo non medico (allegato XVI). Sono stati introdotti controlli più stringenti pre-commercializzazione per i dispositivi ad alto rischio con il coinvolgimento di gruppi di esperti a livello europeo (articolo 106), sono state introdotte regole di classificazione più rigorose (allegato VIII), ed è stato introdotto il sistema di identificazione unica dei dispositivi medici, sistema UDI (*Unique Device Identification*, articolo 28), per la trasparenza e tracciabilità dei prodotti (allegato VI).

Il regolamento si occupa di una miglior protezione della salute pubblica e sicurezza dei pazienti anche grazie al rafforzamento delle disposizioni sulla valutazione clinica e follow-up clinico post-commercializzazione e l'introduzione di una valutazione coordinata delle sperimentazioni cliniche condotte in più di uno Stato Membro.

Valutazione clinica e indagini cliniche

L'MDR prevede maggior dettaglio nella procedura per lo svolgimento delle indagini cliniche e del follow-up post commercializzazione. Infatti il capo VI (articoli dal numero 61 al numero 82), è interamente dedicato alla valutazione clinica e alle indagini cliniche. Gli articoli citati rinviano ai seguenti specifici allegati: allegato XIV: valutazione clinica e follow-up clinico post-commercializzazione suddiviso in: parte A: valutazione clinica e parte B: follow-up clinico post-commercializzazione e allegato XV: indagini cliniche suddiviso in: capo I – requisiti generali, capo II – documentazione relativa alla domanda di indagini cliniche, capo III – altri obblighi dello sponsor.

Vengono introdotte numerose definizioni tra cui quella di sponsor: “qualsiasi persona, società, istituzione oppure organizzazione che si assume la responsabilità di avviare, gestire e curare il finanziamento dell'indagine clinica” (capo I, articolo 2 punto 49) e di sperimentatore “persona responsabile della conduzione di un'indagine clinica presso un sito di indagine clinica” che può essere il fabbricante, il suo mandatario o un'altra organizzazione di ricerca su contratto che svolge indagini cliniche per i fabbricanti.

Al capo I articolo 2 del regolamento sono indicate molte definizioni tra cui quelle di: valutazione clinica (punto 44); indagine clinica (punto 45); dispositivo oggetto di indagine clinica (punto 46); piano di indagine clinica (punto 47); dati clinici (punto 48); evidenze cliniche (punto 51); prestazione clinica (punto 52); beneficio clinico (punto 53).

Nel considerando numero 64 del regolamento, viene fatto esplicito riferimento alla normativa ISO 14155 (4).

La valutazione clinica, definita nell'articolo 61 del regolamento, è un “processo sistematico e programmato atto a produrre, raccogliere, analizzare e valutare in maniera continuativa i dati clinici relativi a un dispositivo per verificarne la sicurezza e le prestazioni, benefici clinici compresi, quando è utilizzato come previsto dal fabbricante”. Nel regolamento viene indicato che la valutazione clinica deve seguire una procedura definita e metodologicamente valida fondata su dati clinici che provengono dalle seguenti fonti:

- studi pubblicati nella letteratura scientifica o indagini cliniche effettuate a norma di tale regolamento, relative a un dispositivo analogo di cui è dimostrabile l'equivalenza al dispositivo in questione;
- indagini cliniche relative al dispositivo in questione.

Quindi una valutazione clinica di un dispositivo può basarsi sui dati clinici relativi a un altro dispositivo solo quando si possa dimostrare l'equivalenza tra i due dispositivi.

Per la dimostrazione dell'equivalenza, nel regolamento, viene fatto riferimento alle caratteristiche tecniche, biologiche e cliniche del dispositivo entrando nel merito delle caratteristiche stesse. È da sottolineare che l'equivalenza tra due dispositivi risulta molto stringente e di difficile dimostrazione.

Nel regolamento, per i dispositivi impiantabili e per i dispositivi della classe III, ossia per quelli a più alto rischio come i dispositivi medici-biomateriali utilizzati in questo settore, è previsto che dopo avere dimostrato l'equivalenza a un dispositivo già commercializzato non fabbricato da lui, il fabbricante del dispositivo rispetti ulteriori condizioni: deve aver posto in essere un contratto con il fabbricante del dispositivo equivalente in maniera da avere pieno accesso alla documentazione tecnica di quel dispositivo e la valutazione clinica del dispositivo equivalente deve essere stata effettuata nel rispetto delle prescrizioni del regolamento.

Il regolamento stabilisce nell'allegato XIV parte A la documentazione necessaria per documentare una valutazione clinica.

Inoltre la Commissione provvede affinché siano designati gruppi di esperti (articolo 106) per esaminare la valutazione clinica. I gruppi di esperti sono composti di consulenti nominati dalla

Commissione in base a competenze cliniche, scientifiche o tecniche aggiornate nel settore e a una distribuzione geografica tale da riflettere la diversità di approcci scientifici e clinici nell'Unione. La Commissione determina il numero di membri di ogni gruppo in funzione delle esigenze.

I membri dei gruppi di esperti assolvono i loro compiti con imparzialità e obiettività e la Commissione istituisce sistemi e procedure per gestire attivamente e prevenire potenziali conflitti di interesse.

Per tutti i dispositivi appartenenti alla classe III e i dispositivi appartenenti alla classe IIb destinati a somministrare all'organismo e/o a sottrarre dall'organismo un medicinale, ai sensi dell'allegato VIII, punto 6.4 (regola 12) prima della valutazione e/o indagine clinica il fabbricante può consultare il gruppo di esperti, allo scopo di valutare la strategia di sviluppo clinico e le proposte di indagine clinica che intende mettere in atto.

Il fabbricante deve tenere in debita considerazione i pareri espressi dal gruppo di esperti. Il modo in cui sono tenuti in considerazione è documentato nella relazione sulla valutazione clinica.

La valutazione clinica e la relativa documentazione devono essere, però, attivamente aggiornate con dati derivanti dalla sorveglianza post-vendita. Il regolamento prevede, al riguardo, l'allegato XIV parte B relativo al *Post Market Clinical Follow-Up* (PMCF), follow-up clinico post-commercializzazione.

Il PMCF è un processo continuo che aggiorna la valutazione clinica dopo la commercializzazione del dispositivo e diventa parte della relazione sulla valutazione clinica e quindi della documentazione tecnica. Se il PMCF ha rivelato la necessità di misure preventive e/o correttive, il fabbricante deve provvedere ad attuarle.

Per i dispositivi appartenenti alla classe III e i dispositivi impiantabili, è previsto che la relazione di valutazione PMCF sia aggiornata con tali dati almeno una volta l'anno.

Il regolamento definisce un'indagine clinica come "qualsiasi indagine sistematica cui partecipano uno o più soggetti umani, volta a valutare la sicurezza o le prestazioni di un dispositivo" e vengono indicate, nell'articolo 62, delle prescrizioni generali relative alle indagini cliniche condotte per dimostrare la conformità dei dispositivi; il dispositivo, oggetto dell'indagine, deve rispettare i requisiti generali di sicurezza e prestazioni applicabili di cui all'allegato I del regolamento a eccezione, ovviamente, degli aspetti che formano l'oggetto dell'indagine clinica.

L'articolo 62 rimanda, per la conduzione delle indagini cliniche, all'allegato XV del regolamento suddiviso in due capi. Il capo I – requisiti generali, indica i principi etici di un'indagine clinica. Infatti le indagini cliniche devono essere svolte secondo la dichiarazione di Helsinki, adottata nel 1964 in occasione della 18ª Assemblea medica mondiale svoltasi a Helsinki (Finlandia), come modificata da ultimo dall'Assemblea medica mondiale. È assolutamente indispensabile che tutte le disposizioni riguardanti la protezione della salute umana siano attuate nello spirito della dichiarazione di Helsinki.

Questo vale per ogni fase delle indagini cliniche, dalla prima riflessione sulla necessità e sulla giustificazione dello studio fino alla pubblicazione finale dei risultati.

Vengono anche indicati i metodi delle indagini cliniche che devono essere realizzate secondo un opportuno piano di indagine clinica.

Il capo II – documentazione relativa alla domanda, indica la documentazione necessaria per la domanda di indagine clinica. Essa comprende due documenti importanti: il piano di indagine clinica/protocollo clinico (CIP, *Clinical Investigational Plan*) e il dossier per lo sperimentatore (IB, *Investigator's Brochure*).

Il protocollo clinico è il documento redatto dallo sponsor e definisce l'obiettivo, la progettazione, la metodologia, le considerazioni statistiche e l'organizzazione dello studio. Fornisce anche il rationale dello studio clinico. Esso deve contenere, anche in conformità alla ISO 14155, le seguenti informazioni:

- informazioni generali di identificazione dell'indagine clinica (numero di identificazione unico, sponsor, sperimentatore principale, centri coinvolti ecc.);
- informazioni sul dispositivo medico;
- razionale dell'indagine clinica;
- obiettivi dello studio clinico;
- rischi e benefici clinici del dispositivo;
- considerazioni etiche;
- considerazioni statistiche
- consenso informato;
- prove precliniche e esperienza clinica precedente;
- descrizione dello studio clinico da eseguire (mono/multicentrico, controllato/non controllato, numerosità del campione, criteri di inclusione ed esclusione clinica, descrizione del periodo di arruolamento, trattamento, follow-up, criteri per la sospensione dello studio, la registrazione e analisi degli eventi indesiderati e gli esiti, gli eventuali fattori che possono compromettere esiti e l'interpretazione dei risultati).

Il dossier per lo sperimentatore è il manuale per lo sperimentatore e contiene le informazioni cliniche e non cliniche sul dispositivo oggetto di indagine. Contiene gli elementi necessari ai fini della valutazione del dispositivo medico.

Per questo deve contenere i seguenti elementi:

- razionale: valutazione che supporti il razionale per l'uso previsto del dispositivo e la progettazione dell'indagine clinica;
- informazioni sul dispositivo oggetto dell'indagine: descrizione generale del dispositivo, dei suoi componenti e dei materiali utilizzati nonché del meccanismo di azione;
- istruzioni del fabbricante per l'uso e l'installazione;
- analisi e la valutazione dei rischi;
- prove precliniche: sintesi e valutazione dei dati *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* pertinenti al dispositivo, compresi gli studi animali;
- dati clinici esistenti: una sintesi della precedente esperienza clinica pertinente con il dispositivo e con altri dispositivi simili;
- elenco dei pertinenti requisiti generali di sicurezza e di prestazione, le norme applicate.

Devono essere tempestivamente portati all'attenzione degli sperimentatori eventuali aggiornamenti del manuale o nuove informazioni disponibili.

Per quanto concerne l'analisi e la valutazione dei rischi, la normativa ISO 14155:2011, a cui si fa riferimento nel Considerando 64 del regolamento, contiene il riferimento alla normativa ISO 14971 "Medical devices–Application of risk management to medical devices" (5) la cui osservanza è il prerequisito essenziale per avviare l'indagine clinica, al fine di ridurre la probabilità che si verifichi un evento negativo durante l'utilizzo del dispositivo medico (resta comunque che si possano utilizzare metodi alternativi, sempre nel rispetto dello stesso livello di efficacia).

Domanda di indagine clinica

Il regolamento prevede l'istituzione di una banca dati europea dei dispositivi medici (EUDAMED) con gran parte delle informazioni rese disponibili al pubblico. Nella banca dati è previsto il sistema elettronico per le indagini cliniche (articolo 73).

Il regolamento prevede, infatti, all'articolo 70, che la domanda di indagine clinica venga presentata mediante il sistema elettronico per le indagini cliniche che genera per l'indagine clinica un solo numero di identificazione a livello dell'Unione Europea; tale numero è utilizzato per tutte

le comunicazioni relative a tale indagine clinica. Quindi in base all'articolo 73 ogni indagine clinica avrà un numero di identificazione unico e dovrà essere registrata nel sistema elettronico.

Lo sponsor, oltre a presentare la domanda di indagine clinica ai singoli Stati Membri in cui vuole condurre una indagine clinica, può presentare un'unica domanda. L'articolo 78 del regolamento prevede, infatti, una procedura di valutazione coordinata per le indagini cliniche. La valutazione da parte degli Stati Membri interessati avverrà sotto la direzione di uno Stato Membro coordinatore.

Nella domanda unica lo sponsor propone come Stato Membro coordinatore uno degli Stati Membri in cui deve essere condotta l'indagine clinica. Gli Stati Membri, nei quali deve essere condotta l'indagine clinica, concordano tra loro, quello che assumerà il ruolo di Stato Membro coordinatore. Se non trovano un accordo su uno Stato Membro coordinatore, assume tale ruolo lo Stato Membro coordinatore proposto dallo sponsor.

La Commissione mediante atti di esecuzione, dovrà specificare ulteriormente le procedure per le valutazioni coordinate degli Stati Membri.

In ogni caso la valutazione degli aspetti di natura intrinsecamente nazionale, locale ed etica (responsabilità, idoneità degli sperimentatori e dei siti di indagine, consenso informato) dovrà avvenire a livello di ogni singolo Stato Membro interessato e ogni Stato Membro definirà la struttura organizzativa da applicare a livello nazionale per l'approvazione delle indagini cliniche.

Per un periodo iniziale di sette anni dalla data di applicazione del presente regolamento, gli Stati Membri possono partecipare alla valutazione coordinata su base volontaria. Trascorso tale periodo ossia dal 27 maggio 2027, tutti gli Stati Membri saranno tenuti a partecipare alla valutazione coordinata.

Entro il 27 maggio 2026 la Commissione presenterà al Parlamento Europeo e al Consiglio una relazione sull'esperienza acquisita sul coordinamento volontario tra gli Stati Membri ed elaborerà una relazione sull'applicazione della procedura di valutazione coordinata e proporrà se del caso una revisione della procedura di valutazione coordinata (articolo 78).

Bibliografia

1. Smith WF, Hashemi J. *Scienza e tecnologia dei materiali*. Milano: Mc Graw-Hill Education; 2012.
2. Italia. Decreto Legislativo 46 del 24 febbraio 1997. Attuazione della direttiva 93/42/CEE, concernente i dispositivi medici. *Gazzetta Ufficiale 54 Supplemento Ordinario* 49 del 6 marzo 1997.
3. Europa. Regolamento (UE) 2017/745 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 5 aprile 2017 relativo ai dispositivi medici, che modifica la direttiva 2001/83/CE, il Regolamento (CE) 178/2002 e il Regolamento (CE) 1223/2009 e che abroga le direttive 90/385 CEE e 93/42 CEE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 117/1 del 5 maggio 2017.
4. UNI EN ISO 14155. *Indagine clinica dei dispositivi medici per soggetti umani – Buona pratica clinica*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2012.
5. ISO 14971. *Medical devices. Application of risk management to medical devices*. Geneva: International Organization for Standardization; 2007.

NORMATIVA EUROPEA SULLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE: TUTELA ED ETICA MIGLIORATE

Paola Meli

Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'utilizzo degli animali per la sperimentazione scientifica da sempre costituisce uno dei problemi più controversi nel rapporto uomo-animale.

Questo dibattito implica una valutazione scientifica alla luce di tutte le riflessioni che i principi di bioetica forniscono nel rispetto di qualsiasi forma di vita umana.

Gli scienziati debbono trovare la giusta dimensione tra le considerazioni etiche legate all'uso di animali senzienti e alla necessità di avere modelli affidabili per lo studio delle patologie umane. Già Darwin ci introduce in questa problematica affermando che: "Una gran parte delle emozioni più complesse sono comuni agli animali più elevati e a noi. Ognuno può aver veduto quanta gelosia dimostri il cane se il padrone prodiga il suo affetto a un'altra creatura; e io ho osservato lo stesso fatto nelle scimmie. Ciò dimostra che non solo gli animali amano, ma sentono il desiderio di essere amati".

I sostenitori della utilità della sperimentazione animale ritengono che ciò porti a innegabili vantaggi per la ricerca medica e fornisca risposte a importanti problemi scientifici. Di contro gli animalisti sostengono che nessuna specie è paragonabile del tutto all'uomo e inoltre che lo stress negli animali di laboratorio invaliderebbe gli esperimenti.

Da quanto sinteticamente esposto si può facilmente dedurre l'indispensabilità di una legge che tenga conto di tutte le istanze. L'adozione di una normativa comune nasce dalla volontà di ravvicinare e armonizzare le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative applicabili negli Stati Membri ai quali peraltro non è tolto il diritto di applicare o adottare misure più rigide di quanto enunciato nel provvedimento legislativo.

La Direttiva 2010/63/CE si prefigge di migliorare le condizioni di vita degli animali da laboratorio, ribadisce fermamente il principio delle 3R (rimpiazzare, ridurre, rifinire), sostiene e incoraggia lo sviluppo di metodi alternativi e raccomanda l'utilizzo di "metodi umanitari" per sopprimere gli animali. Le variazioni che l'Italia ha introdotto si riferiscono essenzialmente alle restrizioni sugli allevamenti per evitare inutili sofferenze.

La legge contrasta situazioni come quelle descritte da Burdin (1) in cui ci sono "maiali costretti in stambugi senza luce. Galline chiuse notte e giorno nell'incubatrice. Oche inchiodate con le zampe al pavimento. Vitelli che passano dalla prigione al macello senza aver mai visto un prato".

Indipendentemente da specifiche considerazioni la riflessione sull'eticità della legge, dovrebbe partire dall'esigenza di incrementare le evidenze scientifiche sull'utilità della sperimentazione stessa, ricevere adeguate informazioni sugli esiti dei progetti che vengono valutati e poi eventualmente autorizzati. Rendere facilmente reperibili i dati relativi ai risultati della sperimentazione e disporre di dati retrospettivi rispetto all'autorizzazione del progetto di ricerca per cui si richiede l'autorizzazione alla sperimentazione consentirebbe di dare un significato diverso al sacrificio dell'animale?

È comunque doveroso chiedersi se sia legittimo, etico e moralmente accettabile decidere di sopprimere un animale pur con tutta la cautela possibile.

La legge sulla sperimentazione animale in qualsiasi realtà territoriale invita a incrementare il ricorso ai metodi alternativi e questo è probabilmente il futuro migliore per gli animali e per le nostre coscienze.

Bibliografia

1. Burdin F. *Un milione di giorni*. Venezia: Marsilio; 2001.

MINISTERO DELLA SALUTE: RACCOMANDAZIONI CLINICHE IN MATERIA DI IMPLANTOLOGIA ORALE

Michele Nardone

Dipartimento della prevenzione e comunicazione, Ministero della Salute, Roma

La necessità di istituire il Sistema Nazionale Linee Guida (SNLG), al quale partecipano le Istituzioni centrali (Ministero della salute, Agenzia Italiana del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità), le Regioni e le Società scientifiche, nasce dalla consapevolezza di erogare cure di buona qualità e basate sull'evidenza scientifica più aggiornata. Inoltre, tale necessità trova riscontro in un momento di più corretta allocazione delle risorse economiche dedicate alla sanità.

In questo contesto, pertanto, assumono particolare rilevanza i seguenti elementi:

- linee guida;
- protocolli diagnostico terapeutici;
- percorsi di cura.

Sono tutti strumenti di indirizzo che rappresentano l'elaborazione di indicazioni basate sulle evidenze scientifiche disponibili, secondo standard raccomandati e nel pieno rispetto del principio di appropriatezza. Hanno come obiettivo quello di assistere i clinici a orientarsi nella grande quantità di informazione scientifica oggi disponibile e di aiutare i pazienti a prendere decisioni in maniera più informata. Rappresentano, inoltre, per quanti si occupano di gestione economica in ambito sanitario, un sistema per un più razionale uso delle risorse economiche, migliorando nello stesso tempo la qualità degli esiti clinici.

Il SNLG definisce quali devono essere le priorità sanitarie ponendo particolare attenzione a tutte quelle tematiche associate a variabilità nella pratica clinica, liste d'attesa, appropriatezza diagnostico-terapeutica, obiettivi individuati dal Piano sanitario nazionale. Importante, infine, è il riconoscimento da parte del SNLG del ruolo delle linee guida nell'aggiornamento professionale e nella formazione continua del personale sanitario.

In pratica, per ogni patologia o percorso diagnostico terapeutico individuato come prioritario, le linee guida sono indirizzi di comportamento clinico, ovvero raccomandazioni, che descrivono le alternative disponibili e le relative possibilità di successo al fine di assicurare il massimo grado di appropriatezza degli interventi, riducendo al minimo le variabilità legate alle insufficienti conoscenze e alla soggettività della definizione delle strategie assistenziali.

Le raccomandazioni di comportamento clinico devono essere basate su una valutazione analitica delle evidenze scientifiche disponibili che, a sua volta, deve essere:

- sistematica, ovvero attenta alla ricerca e alla valutazione critica di tutte le informazioni rilevanti e pertinenti;
- trasparente ed esplicita per quanto riguarda l'interpretazione e l'attribuzione di valore alle singole raccomandazioni;
- condivisa tra i diversi operatori sanitari e i pazienti/cittadini coinvolti.

Quest'attenzione per le regole di base per la elaborazione di raccomandazioni *evidence-based* deriva non da una questione di principio, ma, soprattutto, da studi che hanno messo in luce come i modi di conduzione e realizzazione delle conferenze di consenso o la trasparenza e il rigore metodologico di molte linee guida esistenti prodotte da società scientifiche, lasciano molto a desiderare.

Sempre nell'ottica del miglioramento dell'assistenza sanitaria, pubblica o privata che sia, il Ministero della Salute, in collaborazione con esperti di Regioni e Province Autonome ha provveduto, fin dal 2005, a sviluppare una sorta di "sistema di allerta" per le condizioni cliniche e assistenziali che possono presentare un particolare rischio di errore. Obiettivo precipuo di quanto sopra è quello, tramite l'emanazione di raccomandazioni agli operatori sanitari, di sensibilizzare gli stessi relativamente a talune procedure che possono risultare potenzialmente pericolose e, allo stesso tempo, consigliare strumenti efficaci per mettere in atto azioni in grado di ridurre i rischi e promuovere l'assunzione di responsabilità da parte degli operatori, il tutto con particolare attenzione alla tutela della salute del cittadino-paziente.

In ambito odontostomatologico, sono stati predisposti, pertanto, da parte di esperti delle numerose discipline praticate nell'ambito della professione odontoiatrica, documenti di linee guida basate sull'evidenza scientifica e documenti di indirizzo basati sulla pratica clinica che, in taluni casi, sono stati validati dal Consiglio Superiore di Sanità. Le linee guida nazionali emanate sono:

- *per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età adulta*, (aggiornamento 2015) (1) contenenti indicazioni univoche, condivise e basate sulle migliori evidenze scientifiche disponibili per la prevenzione, nella popolazione adulta, delle patologie dei tessuti duri del dente, delle malattie parodontali, dell'edentulismo e del carcinoma orale.
- *per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età evolutiva*, aggiornamento (2013) (2). Obiettivo del documento è quello di offrire agli operatori sanitari, in particolare al pediatra di libera scelta, indicazioni univoche, condivise e basate sulle migliori evidenze scientifiche disponibili per la prevenzione di carie, gengiviti e parodontiti, stomatiti, problemi ortopedici dei mascellari, nei bambini da zero a quattordici anni.
- *per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali negli individui in età evolutiva che devono essere sottoposti a terapia chemio e/o radio* (2010) (3). Obiettivo delle linee guida è offrire indicazioni univoche, condivise e basate sulle migliori evidenze scientifiche disponibili per la prevenzione e il trattamento delle eventuali patologie che possono insorgere nel cavo orale nei pazienti oncologici in età evolutiva che devono essere sottoposti a trattamenti chemio e radio.
- *per la prevenzione e la gestione clinica dei traumi dentali negli individui in età evolutiva* (2012) (4). Il documento contiene raccomandazioni in materia di prevenzione, diagnosi e cura dei traumi dentali, una delle emergenze odontoiatriche più frequenti nel bambino.
- *per la prevenzione e il trattamento odontoiatrico della sindrome delle apnee ostruttive nel sonno* (2014) (5). Il documento fornisce raccomandazioni e indicazioni per la gestione odontoiatrica della sindrome delle apnee ostruttive nel sonno, negli individui adulti.
- *per la prevenzione e il trattamento odontoiatrico del russamento e della sindrome delle apnee ostruttive nel sonno in età evolutiva* (2016) (6). Il documento fornisce raccomandazioni e indicazioni per la gestione odontoiatrica del russamento e della sindrome delle apnee ostruttive nel sonno (OSAS), negli individui in età evolutiva.

Nell'ambito degli indirizzi di comportamento clinico, anche con il fine di allertare l'operatore su taluni comportamenti tecnici da adottare, il Ministero della salute ha provveduto anche a pubblicare una serie di documenti:

- *Raccomandazione per la prevenzione dell'osteonecrosi della mascella/mandibola da bifosfonati* (2009) (7). Il documento fornisce indicazioni per la corretta gestione dei

pazienti che devono iniziare o hanno già iniziato il trattamento con bifosfonati in ambito oncologico e che devono sottoporsi a manovre chirurgiche odontoiatriche.

- *Popolazione tossicodipendente: indicazioni per la promozione della salute orale e interventi di prevenzione e protezione* (2012) (8). Il documento fornisce indicazioni per promuovere la salute orale, prevenire le patologie orali nei soggetti tossicodipendenti ed evitare le infezioni occupazionali.
- *Raccomandazioni cliniche in odontostomatologia* (2014) (9). Trattasi di un documento che riunisce, in un unico testo, la definizione di approcci terapeutici basati su dati scientifici, in un quadro tecnico di riferimento professionale condiviso a livello nazionale con l'obiettivo di tutelare la salute del cittadino paziente.
- *Raccomandazioni per la promozione della salute orale, la prevenzione delle patologie orali e la terapia odontostomatologica nei pazienti adulti con malattia neoplastica* (2014) (10). Il documento fornisce indicazioni per la gestione dei percorsi clinico-assistenziali di prevenzione e cura delle complicanze orali nei pazienti oncologici trattati con chemio e/o radioterapia.
- *Indicazioni per la promozione della salute orale nelle scuole secondarie* (2014) (11). Il documento fornisce indicazioni a supporto dei docenti che intendano affrontare, con gli studenti delle scuole secondarie di secondo grado, il tema della prevenzione delle principali patologie del cavo orale.
- *Raccomandazioni per la promozione della salute orale in età perinatale* (2014) (12). Il documento contiene indicazioni on indicazioni volte a contribuire al miglioramento della salute orale delle donne in gravidanza, a prevenire le malattie orali nei bambini piccoli, a diffondere informazioni accurate e a garantire l'erogazione di appropriate cure odontoiatriche nelle gestanti.

In particolare in questa relazione vogliamo, inoltre, approfondire le Raccomandazioni Cliniche in odontostomatologia e più precisamente ciò che è stato indicato nel campo dell'implantologia. Nel marzo 2014 il Ministero della Salute ha pubblicato il documento dal titolo "Raccomandazioni cliniche in odontostomatologia" (9), redatto da un ampio gruppo di esperti delle singole branche odontoiatriche. Il documento, ai fini di una maggiore condivisione, è stato revisionato dalle più importanti e rappresentative Associazioni professionali, oltreché dalla Commissione Albo Odontoiatri (CAO) nazionale della FNOMCeO (Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici Chirurghi e degli Odontoiatri), prima dell'approvazione da parte del Consiglio Superiore di Sanità.

Il progetto "Raccomandazioni cliniche in odontostomatologia" è nato con l'obiettivo di garantire, a tutti i cittadini, la qualità delle cure odontoiatriche specie in un momento storico nel quale a causa di una crescente tendenza verso la riduzione generalizzata e incontrollata degli onorari professionali, è sorto il sospetto della possibilità che le prestazioni odontoiatriche potessero essere erogate a livelli qualitativi più bassi con conseguenti situazioni non facilmente gestibili e potenziale danno alla salute del cittadino-paziente.

L'intento, quindi, è quello di avere a disposizione, a livello nazionale, un documento di riferimento, non solo dal punto di vista squisitamente culturale e operativo, ma anche dal punto di vista medico legale.

Il documento, contenente indicazioni sulle principali aree specialistiche dell'odontostomatologia, affronta anche la tematica dell'implantologia orale, riportando indicazioni formulate sulla base dell'evidenza scientifica proveniente da revisione di lavori pubblicati su riviste di settore. In assenza di evidenza, le raccomandazioni sono state formulate sulla base di una discussione fra gli autori e, poi, confrontate in una conferenza di consenso.

L'implantologia orale è una modalità di trattamento indicata per sostituire gli elementi dentali mancanti o quelli a prognosi infausta (1, 3). È una terapia affidabile, con elevata percentuale di successo, accettata dalla comunità scientifica e professionale internazionale, non scevra, tuttavia, di complicanze che vanno tenute in adeguata considerazione e opportunamente gestite (1). Prevede l'utilizzo di impianti dentali, "dispositivi medici" che devono possedere una specifica certificazione che ne attesti i requisiti di sicurezza.

Prima di qualsiasi trattamento implantare, ogni clinico deve:

- verificare la presenza dell'indicazione al trattamento o di eventuali controindicazioni;
- garantire il ripristino di adeguate condizioni di salute dei denti e dei tessuti parodontali;
- effettuare un'attenta progettazione protesica;
- informare il paziente in maniera esaustiva;
- fare opportune valutazioni anamnestiche, diagnostiche e prognostiche;
- mettere in atto trattamenti preventivi e/o terapeutici capaci di ridurre il rischio di complicanze;
- applicare un corretto protocollo clinico (1).

Le indicazioni al trattamento implantare sono:

- instabilità e/o mancanza di ritenzione di una protesi totale mobile;
- instabilità e/o mancanza di ritenzione di una protesi rimovibile;
- disagio psicologico legato alla condizione di portatore di protesi rimovibile;
- riabilitazione fissa di edentulie parziali;
- riabilitazione fissa di edentulie parziali intercalate da più elementi;
- sostituzione di elemento/i in zona visibile;
- sostituzione di uno o più elementi dentali non recuperabili;
- sostituzione di uno o più elementi dentali in presenza di denti contigui sani;
- sostituzione di uno o più elementi dentali contigui a pilastri protesici inaffidabili;
- riabilitazione fissa dell'intera arcata (1).

Le controindicazioni assolute al trattamento implantare sono:

- condizioni sistemiche del paziente che costituiscono un impedimento assoluto a ogni tipo di procedura chirurgica orale;
- la crescita scheletrica non completata (1)

Le controindicazioni relative che possono sconsigliare la terapia implantare sono:

- condizioni cliniche e stili di vita dichiarati nell'anamnesi che comportano un rischio di insuccesso del trattamento (es. gravi stati di dipendenza da droghe; deficit fisici e/o psichici che impediscono o rendono molto difficoltoso eseguire corrette manovre di igiene orale domiciliare; fumo eccessivo; parodontite non trattata o trattata senza successo);
- presenza di una cresta ossea residua (per quantità, qualità e morfologia) non adatta ad accogliere un impianto di dimensioni adeguate alle funzioni da svolgere, quando le procedure chirurgiche per la correzione di tali condizioni anatomiche risultano non attuabili o soggette ad alte percentuali di insuccesso o di complicanze;
- presenza di uno spazio non adeguato per la realizzazione di un manufatto protesico morfologicamente e funzionalmente idoneo, se le procedure per modificare tale situazione non sono attuabili o lo sono con uno sfavorevole rapporto costo/beneficio (1).

Relativamente ai tempi di guarigione ossea attorno agli impianti, le modifiche della forma e delle caratteristiche di superficie degli impianti hanno permesso una riduzione dei tempi di integrazione ossea e, quindi, di trattamento. Ciò ben coincide con l'obiettivo di minimizzare il

disagio funzionale, estetico e psicologico correlato alla mancanza di uno o più elementi dentari, il tutto a beneficio del benessere dei pazienti (1).

In presenza di pazienti che necessitano di estrazione di un elemento dentario irrecuperabile va, generalmente, osservato, prima del posizionamento dell'impianto, un tempo di attesa che può essere compreso tra 6 e 12 settimane nel caso in cui si proceda con una modalità di inserimento implantare precoce o oltre le 12 settimane nel caso si preferisca attendere la completa guarigione dell'alveolo post-estrattivo. In pazienti selezionati e in casi particolari è possibile eseguire una chirurgia implantare post-estrattiva immediata. Trattasi di una procedura complessa che può essere presa in considerazione in condizioni anatomiche, ossee e/o gengivali, ideali così come deve essere eseguita da clinici esperti, specie nelle situazioni dove una particolare attenzione deve essere rivolta alla componente estetica (settori frontali) (1).

In presenza di condizioni cliniche che compromettano la stabilità primaria degli impianti (es: limitata qualità e quantità ossea, carico immediato) è possibile solidarizzare gli impianti tra di loro al fine di diminuire l'effetto delle forze dislocanti. La solidarizzazione deve essere realizzata con metodiche affidabili e aggiornate (1).

In corso di riabilitazioni implanto-protesi e in attesa di osteointegrazione post-inserimento implantare, al fine di garantire un adeguato *comfort* estetico-funzionale, è possibile utilizzare protesi provvisorie fisse o rimovibili, diverse a seconda del tipo e dell'estensione dell'edentulia e in linea con le esigenze del paziente (1).

Poiché è necessario limitare i carichi funzionali precoci che possono mobilizzare gli impianti durante la fase di osteointegrazione, la protesi provvisoria deve essere progettata, costruita e utilizzata in modo da non interferire con la guarigione del sito implantare e con il processo di osteointegrazione. A tale scopo, quando possibile, sono da preferirsi protesi provvisorie ad appoggio dentale rispetto a soluzioni rimovibili ad appoggio mucoso (1).

Solo in casi selezionati è possibile realizzare protesi provvisorie a supporto implantare, con o senza carico funzionale, immediatamente dopo il posizionamento chirurgico degli impianti (1).

La progettazione e la realizzazione della protesi definitiva in implantologia orale rappresenta uno dei momenti più importanti per il conseguimento di un predicibile successo a lungo termine. La precisione dell'interfaccia tra protesi e impianti insieme con il raggiungimento di un idoneo schema oclusale rappresentano alcuni dei fattori fondamentali ai fini della risposta biologica e di una favorevole prognosi a lungo termine della riabilitazione (1).

Per quanto riguarda il tipo di connessione protesi-impianto, avvitata o cementata, non esistono dati scientifici che possano indicare differenze significative in termini di successo e sopravvivenza protesica (1).

Una volta eseguita una riabilitazione implantare, il mantenimento in salute dei tessuti peri-implantari e di tutto il cavo orale necessita di un corretto stile di vita, di una corretta igiene orale domiciliare e di controlli periodici professionali (1).

Nell'ambito dei controlli periodici, oltre a rinnovare la motivazione al paziente per il mantenimento di un buon controllo di placca, è indicato il sondaggio dei tessuti peri-implantari per rilevare l'eventuale esistenza di una patologia infettivo-infiammatoria che, quando presente, deve essere trattata adeguatamente; analogamente è indicato effettuare, periodicamente, il controllo oclusale e, in presenza di complicanze protesiche, è opportuno intervenire precocemente. I controlli radiografici, se necessari e nel rispetto del "principio di precauzione", permettono di confermare la diagnosi clinica, monitorare la precisione e la stabilità della componentistica protesica e verificare il mantenimento del livello di osso marginale (1, 4, 5).

Bibliografia

1. Ministero della Salute. *Linee guida nazionali per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età adulta, aggiornamento*. Roma: Ministero della Salute; 2015. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2441_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
2. Ministero della Salute. *Linee guida nazionali per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età evolutiva, aggiornamento*. Roma: Ministero della Salute; 2013. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2073_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
3. Ministero della Salute. *Linee guida per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali negli individui in età evolutiva che devono essere sottoposti a terapia chemio e/o radio*. Roma: Ministero della Salute; 2010. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_newsAree_1150_listaFile_itemName_0_file.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
4. Ministero della Salute. *Linee guida nazionali per la prevenzione e la gestione clinica dei traumi dentali negli individui in età evolutiva*. Roma: Ministero della Salute; 2012. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1872_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
5. Ministero della Salute. *Linee guida nazionali per la prevenzione e il trattamento odontoiatrico della sindrome delle apnee ostruttive nel sonno (OSAS)*. Roma: Ministero della Salute; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2307_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
6. Ministero della Salute. *Linee guida nazionali per la prevenzione e il trattamento odontoiatrico del russamento e della sindrome delle apnee ostruttive nel sonno in età evolutiva*. Roma: Ministero della Salute; 2016. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2484_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
7. Ministero della Salute e delle Politiche sociali. *Raccomandazione per la prevenzione dell'osteonecrosi della mascella/mandibola da bifosfonati*. Roma: Ministero della Salute e delle Politiche sociali; 2009. (Raccomandazione 10). Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1077_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
8. Ministero della Salute. *Popolazione tossicodipendente: indicazioni per la promozione della salute orale e interventi di prevenzione e protezione*. Roma: Ministero della Salute; 2012. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1889_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
9. Ministero della Salute. *Raccomandazioni cliniche in odontostomatologia*. Roma: Ministero della Salute; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2128_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
10. Ministero della Salute. *Raccomandazioni per la promozione della salute orale, la prevenzione delle patologie orali e la terapia odontostomatologica nei pazienti adulti con malattia neoplastica*. Roma: Ministero della Salute; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2139_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
11. Ministero della Salute. *Indicazioni per la promozione della salute orale nelle scuole secondarie*. Roma: Ministero della Salute; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2288_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.
12. Ministero della Salute. *Raccomandazioni per la promozione della salute orale in età perinatale*. Roma: Ministero della Salute; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2317_allegato.pdf; ultima consultazione 26/03/18.

MATERIALI DENTALI TRA NORME, GIURISPRUDENZA E PUBBLICITÀ

Maria Sofia Rini

Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Scuola di Medicina, Università degli studi di Bologna

Le protesi e i restauri installati in un organismo (biomateriali, materiali da conservativa, ecc.) sono elementi artificiali ed estranei che, anche nelle loro migliori realizzazioni tecniche, conservano le caratteristiche del corpo estraneo che interagisce con l'organismo (1, 2). Materiali metallici nobili e non, non metallici e biologici il cui utilizzo deve rispettare le rigide regole della tutela della salute.

Alla luce dell'attuale sensibilità dell'atto medico e odontoiatrico il crescente dilagare del contenzioso porta alla necessità di una rivalutazione critica dell'argomento e delle obbligazioni connesse alla realizzazione e installazione/finalizzazione di dispositivi su misura e a tutti i ripristini orali, con riferimento specifico anche alle scelte merceologiche effettuate. Dario Betti giustamente sostiene che "Il fondamento razionale, base della definizione degli elementi protesici per cui un intervento medico-chirurgico o odonto-protesico può comportare o meno l'obbligazione di risultato, consiste nella maggiore o minore dominabilità del fattore biologico, confrontata, con quella degli elementi tecnici che intervengono nella realizzazione del risultato finale" (3, 4). Elementi tecnici che, nel contesto delle attuali aspettative di risultato, della necessità costituzionalmente garantita di tutelare beni superiori quali la salute e la vita (2, 5), si scontrano quotidianamente con aspetti pratici della professione medica e odontoiatrica, non scevri di complicità medico legali. Il tema della sicurezza incontra riferimenti di legge e norme che regolamentano l'importazione e l'utilizzo dei materiali dentali (sicuri e non tossici) e prevedono obbligatoriamente certificazioni CE, indicazioni relative alla data di produzione e scadenza, schede tecniche, istruzioni operative e schede di sicurezza, redatte rigorosamente in lingua italiana.

In un'epoca di medicina e odontoiatria difensiva, di contenzioso in espansione, ma anche di pubblicità selvaggia, liberalizzazioni, strutture *low-cost* e medicina e odontoiatria gestite da società di capitale, focalizzare l'attenzione sui materiali dentali, sulle normative di riferimento e sulle eventuali ricadute in termini di responsabilità pare oltremodo opportuno e utile.

La tutela della salute non può ignorare quegli aspetti che, al di là di qualsiasi forma di medicina o odontoiatria difensiva, hanno portato anche il legislatore (in particolare con le leggi Balduzzi e Gelli) (6, 7) a cercare strade di equilibrio tra la tutela di quel bene primario e le difficoltà operative e gestionali della classe medica-odontoiatrica. Né si possono ignorare quei principi di tutela della parte considerata debole, il "paziente" (8). Oggi la rigidità delle classificazioni si è trasformata in uno strumento duttile che è oggetto di interpretazioni e di aggiustamenti funzionali in risposta alla peculiarità del caso concreto e delle richieste di giustizia (9).

La professione odontoiatrica negli ultimi anni ha assistito a un continuo evolversi di materiali e tecniche, che se da un lato hanno sempre più ridotto le possibilità di errori e complicità, dall'altro non hanno potuto escludere fattori di origine meccanica, merceologica e biologica in grado di condizionare in maniera significativa gli esiti dei trattamenti. Nel contempo si è acquisita la consapevolezza dell'importanza dello stato *quo ante* e dell'esistenza, nel contesto di un atto negoziale, quale quello del contratto di cura, di obbligazioni che ricadono anche in capo ai pazienti; obbligazioni relative a un adeguato utilizzo, a una corretta manutenzione igienica, a

controlli periodici ecc. (co-obbligazioni) e che sono in grado di influenzare gli esiti dell'attività odontoiatrica.

Le aspettative di risultato oggi sono sempre più elevate, così come le richieste di funzionalità ed estetica, talora estreme, perché supportate da input pubblicitari troppo spesso molto lontani dalla realtà. Nel contempo, il decremento delle disponibilità economiche ha indotto una pletera di offerte di prestazioni a basso costo, di offerte di "prodotto" scontato e svenduto, in offerta speciale. Anche gli aspetti più prettamente biologici legati a tempi e modalità di guarigione sembrano mutare nel contesto di una gestione commercialmente guidata della medicina e dell'odontoiatria. Si è così posto il problema di come prestazioni a costi estremamente limitati riescano a tutelare la salute e a offrire "prodotti" di qualità difendibile.

Tutele in materia di sicurezza non possono essere derogate e risultano recepite in tutta una serie di disposizioni in materia di importazioni, di requisiti e caratteristiche dei materiali e dei prodotti in circolazione sul territorio nazionale (10). Difficile è il connubio tra caratteristiche merceologiche di materiali utilizzati e utilizzabili e procedure di comprovata efficacia, riferimenti di legge, linee guida, buona pratica, protocolli e costi limitati delle prestazioni erogate, considerando che, anche nelle condizioni ideali, è impossibile escludere in assoluto variabili ed esiti negativi.

La ricerca biomedica si è adoperata al fine di individuare materiali e metodiche applicative e/o di utilizzo sempre più sicuri e anche, talora, a costi più ridotti, ma non sempre con risultati efficaci. Senza contare, poi, che le continue ricerche e innovazioni di fatto hanno prodotto e producono un rapido "invecchiamento" con relativo condizionamento delle verifiche e delle valutazioni a distanza (3, 11).

Tali osservazioni, tuttavia, non possono escludere i più elementari principi di tutela e i riferimenti e il rispetto delle norme comunitarie, nazionali e regionali (12, 13). Le normative Europee prevedono "prodotti sicuri" e di convalidata efficacia (CE, ISO, UNI-EN ecc.), il cui utilizzo sia conforme alle modalità d'uso previste. Le normative nazionali ne recepiscono i principi e ne sottolineano rilevanza, anche relativamente alla forma e ai contenuti delle schede tecniche e di sicurezza, delle dichiarazioni di conformità, ecc.

L'allegazione del mancato o erroneo adempimento della prestazione da parte del paziente, dimostrato il contratto, sposta l'onere della prova a carico del professionista, cui spetta il compito di liberarsi della colpa. In parole semplici il sanitario deve provare e documentare la propria estraneità a ogni ipotesi causale di danno o inadempimento (inversione dell'onere della prova - responsabilità contrattuale, articolo 1218 cc). L'erronea condotta o l'inadempimento, in assenza di "danno" producono effetti negativi sul portafoglio del professionista che potrebbe dover provvedere alla ripetizione della parcella (restituzione). Nel caso in cui dall'improprio o illecito utilizzo di materiali e prodotti derivi "danno" al paziente, il risarcimento dello stesso potrebbe trovare manleva totale o parziale nel contratto di polizza assicurativa (responsabilità extracontrattuale, articolo 2043 cc). Tutela e manleva, tuttavia, che potrebbero venir meno in caso di danni derivanti da utilizzo di materiali, dispositivi, prodotti o procedure non conformi alle norme di legge vigenti o non commercializzabili in Italia.

I limiti dei restauri si scontrano, poi, con le aspettative indotte dagli input pubblicitari, con parametri di funzionalità, ma soprattutto di estetica irraggiungibili. Il concetto esasperato di estetica non sempre si sposa con la tutela della salute e con le disponibilità merceologiche e/o economiche. La diligenza operativa esclude richieste al di fuori degli aspetti giuridici di tutela.

"Scelte di tecniche operatorie o di materiali totalmente difformi dalle regole che il consenso della comunità scientifica e le norme di legge impongono non sono difendibili. È possibile optare tra tecniche operatorie diverse, purché sperimentate e comunque non ripudiate" (14) a patto che sia tutelato sempre e comunque il bene salute (15).

Bibliografia

1. Carbonicini F, Vigolo P, Valenti M, Lucente Lodi G, Gualtieri P, Rini MS. *Tossicologia e reazioni allergiche. Tavola Rotonda sui materiali protesici in odontoiatria*. Milano. Mondadori MegaStore-Aiop; 2015.
2. Italia. Costituzione della Repubblica Italiana. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 298 del 27/12/1947.
3. Rini MS, Sandrini E, Betti D. Considerazioni in merito alla durata degli impianti. *Dental Cadmos* 2007;75(5):69-80.
4. Rini MS, Sandrini E, Betti D. Considerazioni in merito alla durata degli impianti. *Dental Cadmos* 2007;75(5):69-80.
5. Ruffolo U. *La Responsabilità medica*. Milano: Giuffrè; 2004.
6. Puccini C. *Istituzioni di Medicina Legale*. Milano: Ambrosiana; 2003.
7. Italia. DL.vo 158 del 13 settembre 2012. Disposizioni urgenti per promuovere lo sviluppo del Paese mediante un più alto livello di tutela della salute. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 214 del 13 settembre 2012.
8. Italia. Disegno di legge 2224 del 28 gennaio 2016 convertito in Legge 24 dell'8 marzo 2017. Disposizioni in materia di sicurezza delle cure e della persona assistita, nonché in materia di responsabilità professionale degli esercenti le professioni sanitarie. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 64 del 17 marzo 2017.
9. Rossi S. Contatto Sociale (Fonte di obbligazione). In: AA VV, *Digesto delle discipline privatistiche. Settore civile* (V aggiornamento), Torino: Utet; 2010. p. 346 ss.
10. Adamo GL. *L'evoluzione della responsabilità da contatto sociale alla luce delle più recenti pronunce giurisprudenziali*. E-book: Adamo GL; 2016.
11. Agolini G, Gatti M, Raitano A, Rini MS, Sancin AM, Sadonà S. *Norme igieniche in Odontoiatria. Indicazioni, Tossicologia e aspetti Medico-legali*. Bologna: Martina edizioni; 2008.
12. Rini M.S. Borea G, Nuzzolese E, Meleo D, Betti D. Problematiche biologiche e meccaniche in grado di influire sulla durata degli impianti. *Tagete Archives of Legal Medicine and Dentistry* 2009;2(15).
13. Rini MS, Bucci MB. Normative e riflessioni medico-legali in materia di PRF. In: Bedini R, Pecci R, Meleo D, Meli P. *Convegno Nazionale FORM. Forum On Regenerative Methods. Le metodologie rigenerative nel Servizio Sanitario Nazionale: applicazioni attualmente utilizzate*. Atti. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015 (ISTISAN Congressi 15/C1).
14. Italia. Decreto Legislativo 211 del 24 giugno 2003. Attuazione della direttiva 2001/20/CE relativa all'applicazione della buona pratica clinica nell'esecuzione delle sperimentazioni cliniche di medicinali per uso clinico. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 184, *Supplemento Ordinario* 130 del 9 agosto 2003.
15. Rini MS. *La responsabilità dell'odontoiatra. La responsabilità civile*. Milano: Utet Giuridica. 2005. p. 930-39.
16. Rini MS. I materiali e la difendibilità del prodotto. In: Bedini R, Pecci R, Meleo D, Meli P. *Convegno Nazionale FORM. Forum On Regenerative Methods. Le metodologie rigenerative: applicazioni innovative in odontostomatologia e ortopedia*. Atti. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016 (ISTISAN Congressi 16/C1).

È POSSIBILE DISCOSTARSI DALLE LINEE GUIDA?

Maria Sofia Rini

Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie–Scuola di Medicina, Università di Bologna

Premessa

Cassazione Penale a Sezioni Unite del dicembre 2017: «L’ esercente la professione sanitaria risponde, a titolo di colpa, per morte o lesioni personali derivanti dall’ esercizio di attività medico-chirurgica, se l’ evento:

- a) si è verificato per colpa (anche “lieve”) da negligenza o imprudenza;
- b) si è verificato per colpa (anche “lieve”) da imperizia quando il caso concreto non è regolato dalle raccomandazioni delle linee-guida o dalle buone pratiche clinico assistenziali;
- c) si è verificato per colpa (anche “lieve”) da imperizia nella individuazione e nella scelta di linee-guida o di buone pratiche clinico-assistenziali non adeguate alla specificità del caso concreto;
- d) si è verificato per colpa “grave” da imperizia nell’ esecuzione di raccomandazioni di linee-guida o buone pratiche clinico-assistenziali adeguate, tenendo conto del grado di rischio da gestire e delle speciali difficoltà dell’ atto medico» (1).

Introduzione

Quanto premesso testimonia un espresso e costante riferimento alle linee guida e alle buone pratiche negli attuali orientamenti giurisprudenziali e nel nuovo assetto normativo in materia di responsabilità medica e odontoiatrica, con particolare riferimento alla Legge 24/2017 (e non solo) (2). Si ritengono, pertanto, importanti, opportuni e utili alcuni approfondimenti anche in un contesto in cui prevalentemente ci si occupa di evoluzioni bio-tecnologiche. Nella pratica clinica quotidiana in evidenza di esiti positivi, di norma, non si rilevano contestazioni o recriminazioni.

Diverso è, invece, il caso, di terapie a esito negativo, infausto o, comunque, non conforme alle aspettative. Nonostante il ruolo di raccomandazioni non vincolanti, ma intrinsecamente legate al caso di specie, ci si interroga in merito a quanto il rapportarsi a percorsi assistenziali predeterminati di fatto garantisca in assoluto il professionista dai risvolti di un’ eventuale responsabilità (penale, civile, disciplinare, amministrativa, gestionale, ecc.) e, qualora ritenuto necessario, di quanto ci si possa discostare da tali riferimenti (2-5).

Il concetto di efficacia ed efficienza di un intervento sanitario si correla a quello di qualità della prestazione erogata, nel senso di qualità percepita e qualità concreta.

Evidentemente questo concetto deve trovare dei riferimenti in “unità di misura” rapportate o rapportabili a valori o a tipologie di condotte medie standardizzate e scientificamente riconosciute (*evidence-based*) (2). Standard che garantiscano l’ aderenza dell’ intervento praticato a un livello minimo e imprescindibile di qualità (2, 6-8). Qualità che non può ignorare le evoluzioni tecnologiche e metodologiche e l’ applicabilità delle stesse in termini pratici. Nella attività clinica quotidiana, infatti, con una certa frequenza non ci si rapporta con condizioni ideali o standard ripetibili. Ciascun paziente è unico, pur nel contesto di un generico e comune inquadramento

nosologico, e si rapporta a una serie di condizioni e situazioni proprie del caso specifico, ovvero intrinseche all'alea della matrice biologica (2).

Terminologia

In prima istanza è opportuno necessario inquadrare la terminologia utilizzata (2, 9-11).

Con il termine “Protocolli” si definiscono modelli comportamentali attraverso la descrizione di una successione di interventi volti al raggiungimento di un determinato obiettivo (2). Mentre con il termine “Procedure” si descrivono sequenze dettagliate e logiche di atti al fine di uniformare gli stessi per il raggiungimento della qualità degli effetti risultanti (insieme di azioni professionali finalizzate all'obiettivo con efficacia ed efficienza, che nel contempo consentono la riproducibilità e la trasferibilità della modalità esecutiva specifica) (2). I “Percorsi diagnostico-terapeutici” definiscono invece la sequenza di azioni che (utilizzando linee guida, protocolli, procedure e raccomandazioni) devono essere svolte nella gestione di uno specifico problema di salute. Sulla base di tali percorsi si identificano le responsabilità delle diverse figure professionali intervenute e gli standard clinici e organizzativi. Trattasi dell'iter che un paziente dovrebbe seguire al fine di risolvere un problema di salute secondo la migliore sequenza temporale, spaziale, procedurale sulla base delle conoscenze tecnico-scientifiche e delle risorse umane (personale) e tecnologiche (2). Le “Linee guida” rappresentano raccomandazioni aggiornate (indicazioni procedurali, atti di indirizzo comportamentali) in grado di orientare e assistere il professionista nella scelta delle modalità di intervento e assistenza più appropriate nelle specifiche situazioni cliniche (orientare la pratica clinica quotidiana). La forza di tali raccomandazioni va da A, pratica sostenuta dalle evidenze e dall'esperienza degli esperti, a E, pratica sconsigliata. (2). Il Ministero della Salute ha elaborato e aggiornato una serie di raccomandazioni cliniche.

Le “Buone pratiche clinico-assistenziali” rappresentano un “distillato di esperienza, conoscenza e buon senso” che non può prescindere dalla diligenza e dalla prudenza inglobando conoscenza ed etica, utili e opportune sia nella clinica quotidiana che nella ricerca scientifica (2). Infine il “Rischio Clinico”: nella pratica clinica esistono delle probabilità che il paziente sia vittima di un evento avverso, che subisca un danno o un disagio (anche involontario) in relazione alle cure cui è stato sottoposto (2).

Linee guida e buone pratiche

Linee guida e buone pratiche, sebbene si prestino a letture non sempre univoche (12-14), offrono al professionista, gravato dall'onere di difendere il proprio operato, un riferimento anche nel contesto del rapporto e dell'eventuale contenzioso con il paziente o con la struttura (15-16). Al professionista si chiede comunque la dimostrazione del corretto adempimento e l'esclusione di ipotesi di condotte causative di danno o inadempimento a lui non imputabili con riferimento a modelli comportamentali, linee di condotta, raccomandazioni aggiornate (17-19).

Frequentemente, purtroppo, i riferimenti alle linee guida e alle buone pratiche consolidate sono interpretati quali “limitazioni” dell'attività del medico o dell'odontoiatra (20) o erroneamente utilizzate nella valutazione della stessa da parte di terzi (consulenti, periti e/o giudici). In tale prospettiva gli effetti di questi riferimenti snaturerebbero l'attività clinica e non tutelerebbero la salute del paziente. Linee guida e buone pratiche, infatti, diverrebbero rigide barriere costituite da condotte predeterminate, in vista di un esercizio meccanicistico della medicina atteggiato in senso difensivo, che potrebbe rivelarsi inutile se non addirittura dannoso. Una medicina in generale e

una odontoiatria computerizzate all'interno delle quali non ci sarebbe posto per la "mente pensante" del professionista né per la specificità (21) e unicità del paziente (2, 22). Di fatto riferimenti e regole non dovrebbero rappresentare una limitazione o un ostacolo, ma dovrebbero, una volta realizzate e costantemente aggiornate (vedi attività del Ministero della Salute), favorire l'attività medica, nell'interesse della salute del paziente. Tali riferimenti si discostano dal rigido intendimento dei divieti, la cui non ottemperanza comporta necessariamente l'erogazione di una sanzione (es. divieto di sosta).

L'applicazione o la mancata applicazione degli stessi deve risultare supportata da un logico processo valutativo delle condizioni e della peculiarità del singolo paziente (individuo) alla luce della specifica situazione. Ossia la condotta del professionista deve risultare "giustificata" da un iter logico che ha tenuto conto del caso di specie e dell'esistenza di riferimento e regole. Nel contesto di una valutazione retrospettiva inerente alla condotta del professionista, il sanitario deve poter affermare di aver operato conformemente a un certo modello che vigeva all'epoca del suo intervento o che, pur conoscendo la linea guida, condizioni di tempo, di luogo, specifiche del paziente ne impedivano l'applicazione o consigliavano scelte difformi.

Le raccomandazioni delle linee guida e delle buone pratiche assistenziali, scientificamente accettabili, non possono essere applicate secondo le comuni regole del diritto ordinario. La funzione della linea guida è anche quella di rendere trasparente e tracciabile l'azione del medico. Vi sono casi in cui il discostarsi del professionista da una certa regola implica l'assunzione, che diviene doverosa, di un certo rischio, così imponendo una diligenza particolarmente qualificata. Vi sono dei casi (non infrequenti nei diversi ambiti di cure) in cui la linea guida è data per un certo standard di astratte condizioni cliniche, che non sono quelle del paziente concretamente trattato. Ne consegue che l'osservanza della linea guida potrebbe rappresentare di per sé inadempimento della doverosa regola cautelare di prudenza, foriera di futuro addebito di responsabilità professionale. Le regole delle linee guida sono prevalentemente riconducibili al modello di perizia e, entro certi limiti, di diligenza, con riferimento a uno specifico contesto. Mutando il contesto applicativo, evidentemente, ci si può discostare dal riferimento (la regola non può, ma deve cambiare). È innegabile che nel compiere la scelta terapeutica nel terzo millennio l'attività clinica debba essere guidata da un riferimento che deriva dalle evidenze scientifiche e dal loro costante evolversi.

Pertanto, regole/raccomandazioni possono e devono cambiare nel tempo per rimanere attuali. In parole semplici manca l'esplicitazione, la documentazione dell'iter logico che ha condotto in quel caso specifico alla procedura terapeutica prescelta ed eseguita (2, 23). Se il medico o l'odontoiatra deve dare la prova di essere stato adempiente, deve provare di aver assolto ai doveri di diligenza e prudenza al momento richiesta, di aver operato una scelta corretta da un punto di vista della perizia (si è formato, si è aggiornato, ha valutato il caso di specie e quindi ha scelto un determinato farmaco, una determinata terapia o un determinato modo di eseguirla). La funzione di indirizzo delle linee guida e delle buone pratiche si pone questa prospettiva (24). Il medico (o l'odontoiatra) può applicarle o ignorarle, assumendosene il rischio (2). Se le osserva sempre e comunque si assume il rischio di una erronea o inappropriata applicazione. Se non le osserva deve dimostrarne le ragioni logiche, assumendosene tutte le responsabilità (rispondere delle conseguenze).

La linea guida è un criterio, una direttiva che implica il potere discrezionale del medico e dell'odontoiatra nel momento in cui agisce (2, 25-26). In tutti i casi il professionista ha la responsabilità della propria scelta proiettandola anche sulle sue conseguenze (2). In alcuni casi è opportuno seguire la linea guida perché è espressione della statistica (in un certo numero di casi hanno dato buone prove). In altri casi non essendo il modello conforme al dato statistico sulla base del quale è stata redatta la linea guida non deve essere seguita.

Le linee guida e le buone pratiche devono essere intese nel modo corretto: raccomandazioni alle quali occorre porre confronto critico e iter logico. Non ci si deve, adagiarsi su di esse. La scelta è a discrezione del medico che opera con la consapevolezza del riferimento statistico e scientifico, in un contesto che non può prescindere da principi di etica clinica, nella prospettiva di maggiore tutela dei vulnerabili (25-28).

I riferimenti alle linee guida e alle buone pratiche (regole, prassi, ecc.) riportato nel recente dispositivo di legge (Legge 24/2017) rappresenta di fatto una grande novità sul quale portare un elevato grado di attenzione.

Valutazione dell'operato del medico o dell'odontoiatra

La salute generale e orale contribuisce al benessere di ciascun individuo (27-29). Anche l'assenza di un'idonea condizione di salute orale può determinare dolore, sofferenza, invalidità e scadimento delle condizioni generali di un individuo. L'idoneo ripristino di una condizione di salute è frutto di scelte progettuali, procedurali, comportamentali e realizzative in linea con le condizioni fisiche, economiche e sociali dell'individuo e con comportamenti clinici di comprovata ed evidente efficacia e qualità (linee guida e buone pratiche), se e quando applicabili al soggetto, e al caso di specie, in relazione agli obiettivi e alle priorità locali (28).

Non sempre le condizioni fisiche, economiche e sociali dell'individuo trovano riscontro specifico con comportamenti clinici di comprovata ed evidente efficacia e qualità, ossia con linee guida e raccomandazioni standardizzate. Non sempre si pongono quelle condizioni di ripetitività di situazioni e soluzioni. Talora addirittura si sovrappongono "condizioni e premesse" tanto da non trovare riferimenti clinicamente applicabili in alcuna linea guida (linee guida inesistenti) (2) o da raffrontarsi con tipologie di pazienti non descritte negli standard di riferimento (2-30). I suddetti riferimenti, infatti, in un'ottica di "qualità e sicurezza delle cure" (19, 31-32) possono non risultare sufficienti. L'individualità della scienza e coscienza, l'esperienza maturata assieme al confronto critico con colleghi di comprovata esperienza e buon senso, che di norma non garantirebbero obiettività, completezza, efficacia e sicurezza della specifica condotta terapeutica (2, 30), intervengono in tali evenienze e nel caso di specie ad affiancare, nel contesto di "una buona pratica clinica" gli standard raccomandati (33-35).

Nel contesto della valutazione della condotta professionale del sanitario sono gli stessi medici o odontoiatri a portare le linee guida e le buone pratiche nei processi. Il Consulente tecnico svolge una funzione fondamentale e si assume un'enorme responsabilità perché indica al Giudice la conoscenza nel contesto di una disciplina diversa da quella giuridica.

La sentenza è compito del Giudice, ma il tecnico gli indica, rispondendo a un quesito che si auspica essere stato correttamente formulato, a dire se una determinata terapia sia stata eseguita correttamente. Il consulente specialista deve costruire un ragionamento che sia convincente e sintetizzato, in poche chiare espressioni o pareri, la base sulla quale il Giudice traduce l'accaduto o i postumi, per esempio, in punti di invalidità, in quantum risarcitori, o in esclusione di colpa.

Il consulente tecnico deve ricostruire quel certo percorso logico che ha portato a determinate scelte. Percorso fondato sulle regole dell'arte, che assomigliano a quelle linee guida e a quelle buone pratiche più facili da individuare e sintetizzare per un addetto ai lavori, per un tecnico specialista in quell'arte e in quella pratica.

Il compito del consulente è di mettere a confronto quello che è stato fatto con quello che astrattamente verrebbe richiesto secondo un certo standard e, sulla base di tale rapporto, valutare se la condotta sia stata conforme o meno. In caso di conformità, il medico o l'odontoiatra è stato perito, in caso di difformità il consulente dovrà indicare se il professionista sia stato inadempiente. Prima di arrivare a tale drastica conclusione è necessario eseguire un ulteriore accertamento, ossia

occorre verificare se lo standard di riferimento sia davvero comparabile con la situazione analizzata (36).

Lo strumento delle linee guida deve essere, in ogni caso, considerato alla luce del relativo valore del sistema di conoscenze legato al momento storico della loro elaborazione e del fatto che, per la scienza (arte) medica, le leggi esplicative hanno prevalentemente carattere statistico e solo raramente universale. Nel caso di linee guida tra loro contrastanti, la scelta riguardo quella più affidabile per la valutazione di eventuali responsabilità, ai sensi dell'articolo 40 (comma 2) c.p., spetta inevitabilmente al giudice (su suggerimento dei periti), con la precisazione che tuttavia non può trattarsi di una scelta ad libitum ma improntata sulla base del loro diverso grado di evidenza scientifica (37, 38).

La prudenza, che pur s'impone nel giudizio retrospettivo in tema di responsabilità, richiede comunque l'adozione di tale strumento di verifica che, pur non essendo perfetto, può guidare con un sufficiente margine di affidabilità nell'accertamento dell'esistenza del cosiddetto potere scientifico di impedire l'evento (39). Solo in questi termini deve essere interpretata la natura di *leges artis* delle conoscenze e della prassi medica (EBM), intendendosi per *leges* non già delle vere e proprie leggi da cui desumere inderogabili norme di condotta, bensì orientamenti dotati di vario grado di validità in accordo con l'autentica natura dell'arte medica (40, 41).

In parole semplici si può desumere che le linee guida rappresentano importanti e utili strumenti per la codificazione temporanea di condotte diagnostiche e terapeutiche, con carattere d'orientamento e non di tassatività assoluta; in questo contesto va applicato il principio della personalizzazione dei trattamenti medico-chirurgici e proprio la deroga a quest'esigenza, anzi, può costituire, in non pochi casi, una violazione colposa da parte del medico delle regole generali di diligenza e prudenza (42).

Quanto fino a ora espresso è il vero tema delle linee guida e delle buone pratiche che a volte devono essere osservate, ma dalle quali talora occorre discostarsi, perché il contesto applicativo assistenziale "attuale" non consente altrimenti. Dottrina e giurisprudenza più remota (sentenza della Corte Costituzionale 282 del 26 giugno 2002, la quale afferma: «salvo che entrino in gioco diritti o doveri costituzionali non è di norma il legislatore a dover stabilire direttamente e specificatamente quali siano le pratiche terapeutiche ammesse, con quali limiti e a quali condizioni [...] poiché la pratica dell'arte medica si fonda sulle acquisizioni scientifiche e sperimentali, che sono in continua evoluzione, la regola di fondo in questa materia è costituita dall'autonomia e dalla responsabilità del medico, che, sempre con il consenso del paziente, opera le scelte professionali basandosi sullo stato delle conoscenze a disposizione») (44) e recente (sentenza Cassazione sez. IV 1873/2010, disponibile all'indirizzo: <https://archivioldpc.dirittopenaleuomo.org/upload/Cassazione%20linee%20guida%20medico.pdf>) (45) non mancano di sottolineare quest'appello alla coscienza critica ed etica del professionista sanitario più accorto, che ancora una volta costituisce l'unico e solido baluardo contro l'attuale deriva di medicina difensiva (46) <https://archivioldpc.dirittopenaleuomo.org/d/549-la-colpa-medica-non-solo-linee-guida> (Corte di Cassazione, Sezioni Unite, udienza del 21/12/201, sentenza 10952/2017).

Spettano al clinico il processo critico di scelta e l'annotazione/documentazione diligente di ogni risoluzione prescelta. Il medico legale o l'odontoiatra legale, invece, esperto della disciplina, porta all'interno del processo e del contendere, i riferimenti alle regole di perizia, prudenza e diligenza, che costituiranno elementi di prova all'interno del processo, che concorreranno, presupposti essenziali, a formare l'assolvimento dell'onere della prova e che saranno gli elementi che legittimerà il Giudice a prendere le sue decisioni. Nel fare questo il medico/odontoiatra legale, nelle vesti di CTU (Consulente Tecnico d'Ufficio), non è solo. Le parti attraverso i propri legali e i propri consulenti dovranno riuscire a portare dentro elementi di prova utili.

Conclusioni

Le linee guida rappresentano importanti e utili strumenti per la codificazione temporanea di condotte diagnostiche; esse non escludono l'opzione e l'autonomia delle scelte all'interno dei metodi diagnostici e terapeutici accreditati dalla scienza medica; le linee guida e le buone pratiche non sono diritto positivo e non escludono un sano buon senso correlato al caso specifico, che evita la deriva di medicina difensiva. Certamente utili, esse vanno apprezzate per quello che rappresentano ("raccomandazioni"), punto di partenza per la scelta del clinico, in vista del migliore interesse del paziente. Qualsiasi sia la scelta terapeutica o diagnostica, ciascun professionista ne deve tener conto, osservandole o discostandosene, in ogni caso in maniera motivata.

La Suprema Corte in ordine alle linee guida ammonisce circa la necessaria protezione di beni preziosi e diritti fondamentali della persona: «non, dunque, norme regolamentari che specificano quelle ordinarie senza potervi derogare, ma regole cautelari valide solo se adeguate rispetto all'obiettivo della migliore cura per lo specifico caso del paziente e implicanti, in ipotesi contraria, il dovere, da parte di tutta la catena degli operatori sanitari concretamente implicati, di discostarsene».

La sentenza della Corte Costituzionale 282 del 26 giugno 2002 (<https://www.cortecostituzionale.it/actionSchedaPronuncia.do?anno=2002&numero=282>) afferma: «salvo che entrino in gioco diritti o doveri costituzionali non è di norma il legislatore a dover stabilire direttamente e specificatamente quali siano le pratiche terapeutiche ammesse, con quali limiti e a quali condizioni [...] poiché la pratica dell'arte medica si fonda sulle acquisizioni scientifiche e sperimentali, che sono in continua evoluzione, la regola di fondo in questa materia è costituita dall'autonomia e dalla responsabilità del medico, che, sempre con il consenso del paziente, opera le scelte professionali basandosi sullo stato delle conoscenze a disposizione».

Bibliografia

1. Cassazione, Sezioni Unite Penali. Sentenza 8770 del 22 febbraio 2018 in materia di responsabilità medica. Disponibile all'indirizzo: <https://www.biodiritto.org/ocmultibinary/download/3259/31842/8/ba374071a4619dfb28edf5d0587fb316/file/cass-pen-sez-un-2018-8770.pdf>. Ultima consultazione 16 dicembre 2020.
2. Rini MS, Zerbo S, Argo A, Ventura Spagnolo E, Bucci MB, D'Urso D. Quando bisogna discostarsi dalle linee guida? I casi problematici nella prassi odontoiatrica. *Dental Cadmos*, 2018;86(8):548-57.
3. De Matteis R. Responsabilità e servizi sanitari. Modelli e funzioni. In AA.VV. *Trattato di diritto commerciale e di diritto pubblico dell'economia, diretto da Galgano*. Padova: CEDAM, 2007. p. 372.
4. Bucci MB, Rini MS. *Odontoiatria Legale e Forense*. San Lazzaro di Savena (BO): Bonomo; 2017.
5. Bucci MB, Rini MS. *Responsabilità professionale in Odontoiatria. Riferimenti normativi, Giurisprudenziali e di Medicina Legale*. San Lazzaro di Savena (BO): Bonomo; 2017.
6. Giere RN. *Spiegare la scienza*. Bologna: Il Mulino; 1996.
7. Mach E. *La meccanica nel suo sviluppo storico-critico*. Torino: Universale Bollati Boringhieri; 1992.
8. Rini MS. I materiali dentali e la difendibilità del prodotto. In Bedini R, Pecci R, Meleo D, Meli P. (Ed.). *3° Convegno nazionale FORM–Forum On Regenerative Methods. Metodiche rigenerative: applicazioni innovative in odontostomatologia e ortopedia*. Roma, 7-8 aprile 2016. Atti. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016 (ISTISAN Congressi 16/C1). p. 33.
9. Zagra M, Argo A, Madea B, Procaccianti P. Medicina e nursing delle evidenze In: *Medicina legale orientata per problemi*. Milano: Elsevier; 2011. p.119 ss.

10. Dall'Olio L, Scuderi A, Rini MS, Valente S, Farruggia P, Bucci MA, Pasquinelli G, Acacci A, Roncarati G, Leoni E. Effect of different disinfection protocols on microbial and biofilm contamination of dental unit waterlines in community dental practices. *Int. J. Environ Res Public Health*. 2014;11:2064-76.
11. Rini MS, Gatti M, Prevenzione delle infezioni in odontoiatria: disinfezione e sterilizzazione. *Dental Cadmos* 2011;6(79):347-56.
12. Guyatt GH. Evidence-based medicine. *ACP J Club* 1991;114(2):A16.
13. Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *BMJ* 1996;312:71.
14. Charlton BG. The zombie science of evidence-based medicine: a personal retrospective. A commentary on Djulbegovic B, Guyatt GH, Ashcroft RE. *Cancer Control* 2009;16:158-68.
15. Barni M. Evidence based medicine e medicina legale. *Riv It Med Leg* 1998;20(1):3-9.
16. Terrosi Vagnoli E. Le linee guida per la pratica clinica: valenza e problemi medico legali. *Riv It Med Leg* 1999;21(1):189-232.
17. Italia. Legge 189 del 8 novembre 2012. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 158 del 13 settembre 2012, recante disposizioni urgenti per promuovere lo sviluppo del Paese mediante un più alto livello di tutela della salute. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale 263 del 10 novembre 2012, Supplemento Ordinario 201* (in particolare, art. 3—Legge Balduzzi).
18. Italia. Legge 24 del 24 marzo 2017. Disposizioni in materia di sicurezza delle cure e della persona assistita, nonché in materia di responsabilità professionale degli esercenti le professioni sanitarie. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale 64 del 17 marzo 2017* (Legge Gelli).
19. Ministero della Salute. Raccomandazioni cliniche in odontostomatologia. Roma: Ministero della Salute; 2017. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2637_allegato.pdf. Ultima consultazione 19 novembre 2020.
20. Rotolo G. Guidelines e leges artis in ambito medico. *Riv It Med Leg* 2013;1:269-97.
21. Danda D. Next generation evidence-based medicine: individualised, personalized and humanised. *Int J Rheum Dis* 2013;16(6):615.
22. Massoni F, Ricci P, Ricci S. Does the patient or pathology exist? *J Med Pers* 2014;12:5-8.
23. Occorso V. Cartella clinica e responsabilità medica, Milano: Giuffrè; 2011.
24. Cassano G, Cirillo B. Odontoiatra. In *Casi di responsabilità medica*. Santarcangelo di Romagna (RN): Maggioli Editore; 2013. p. 463-79.
25. Upshur RE. A call to integrate ethics and evidence-based medicine. *Virtual Mentor* 2013;15(1):86-9.
26. Mike V. Outcomes research and the quality of health care: the beacon of an ethics of evidence. *Eval Health Prof*. 1999;22(1):3-32.
27. Nardone M. Linee Guida in Odontoiatria. In Bucci MB, Rini MS *Odontoiatria legale e forense* (volume I). Bologna: Bonomo Editore; 2017.
28. Rini, MS, Colucci C, Bucci MB, Argo A. Maltrattamento dei minori sotto gli occhi di tutti: gli obblighi dell'odontoiatra. *Dental Cadmos* 2017;85(10):647-56.
29. Demarosi F. EBM-EBD: La letteratura a supporto dell'attività clinica. In Bucci MB, Rini MS. *Odontoiatria Legale e Forense* (volume I). Bologna: Bonomo Editore; 2017.
30. Sniderman AD, La Chapelle KJ, Rachon NA, Furberg CD. The necessity for clinical reasoning in the era of evidence-based medicine. *Mayo Clin Proc* 2013;88(10):1108-114.
31. Ministero della Salute. Dipartimento della sanità pubblica e dell'innovazione Raccomandazioni Cliniche in Odontostomatologia. Roma: Ministero della Salute; 2014. Disponibile all'indirizzo:

- http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2128_allegato.pdf. Ultima consultazione 16 dicembre 2020.
32. Ministero della Salute. Linee guida per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età adulta. Roma: Ministero della Salute; 2015. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2441_allegato.pdf. Ultima consultazione 16 dicembre 2020.
 33. Crosby E. Review article: the role of practice guidelines and evidence-based medicine in perioperative patient safety. *Can J Anaesth* 2013;60(2):143–15.
 34. Kohn LT, Corrigan JM, Donaldson MS. *To Err Is Human: Building a Safer Health System*. Institute of Medicine (U.S) Committee on Quality of Health Care in America. Washington, DC. National Academies Press. 1999.
 35. Argo A, Seidita F, Zerbo S, Messina P, Scardina GA *et al*. Linee guida in ortodonzia e attuale valutazione dei profili di responsabilità. *Dental Cadmos* 2016;84(3):161-8.
 36. Spatafora F, Argo A, Campisi G. Il ruolo dell'odontoiatra nella medicina estetica: norme e indicazioni. *Dental Cadmos* 2012;6:301-18.
 37. Ferrara SD, Baccino E, Bajanowski T *et al*. Malpractice and medical liability. European guidelines on methods of ascertainment and criteria of evaluation. *Int J of legal medicine* 2013;(127):545-57.
 38. Graham ID, Beardall S, Carter AO. What is the quality of drug therapy clinical practice guidelines in Canada? *Can Med Ass J* 2001;165:157-63.
 39. Grilli R, Magrini N, Penna A, Mura G, Liberati A. Quality of practice guidelines developed by specialty societies. The need for a critical appraisal. *Lancet* 2000;355:103-6.
 40. Ferrante ML. L'accertamento del potere scientifico di impedire l'evento. Le linee guida. In Ferrante ML. *Gli obblighi di impedire l'evento nelle strutture sanitarie complesse*. Napoli: Satura Editrice; 2005. p. 117 e ss.
 41. Naylor CD. Grey zones of clinical practice: some limits to evidence-based medicine. *Lancet* 1995; 345(8953):840-42.
 42. Wenger DR. Limitations of evidence-based medicine: the role of experience and expert opinion. *J Pediatr Orthop* 2012;32:S187–S92. Suppl. 2.
 43. Balducci L. Practical guidelines that may kill. *J Med Pers* 2014;12:96-98.
 44. Italia. Sentenza della Corte Costituzionale 282 del 26 giugno 2002. *Gazzetta Ufficiale Serie Ordinaria* 26 del 3 luglio 2002. Disponibile all'indirizzo: <http://www.giurcost.org/decisioni/2002/0282s-02.html>. Ultima consultazione 19 novembre 2020.
 45. Buccelli C, Abignente I, Niola M, Paternoster M, Graziano V, Di Lorenzo P. La rilevanza delle linee guida nella determinazione della responsabilità medica. Le novità introdotte dalla cd. legge Balduzzi, le problematiche connesse, i tentativi di risoluzione. *Riv It Med Leg* 2016;(2):665.
 46. Niola M, Buccelli C, Graziano V *et al*. Odontoiatria difensiva nell'era del less is more. *Dental Cadmos* 2017;(85)7;435-42.

TECNOLOGIE INNOVATIVE E L'ETICA

Paola Meli

Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'innovazione tecnologica, supportata dal progresso della bioingegneria, ha notevolmente modificato l'approccio diagnostico e terapeutico e riabilitativo offrendo numerose e variegata possibilità di gestione della malattia. Le tecnologie sanitarie ovvero: le attrezzature sanitarie, i dispositivi medici, farmaci, sino alle procedure mediche e chirurgiche nonché i percorsi assistenziali nei quali viene erogata assistenza sanitaria, rappresentano un settore molto ampio riferendosi a tutte le applicazioni pratiche della conoscenza che vengono utilizzate per promuovere la salute, prevenire, diagnosticare e curare le malattie.

Affinché le nuove tecnologie, così come le nuove applicazioni di tecnologie già esistenti in Sanità, possano consentire all'SSN di mantenere il suo carattere di universalità, garantendo a tutta la popolazione l'erogazione di prestazioni innovative efficaci e appropriate è necessario disporre di strumenti e metodologie che consentano di valutare attentamente la loro sicurezza i possibili rischi presenti e futuri.

È altresì necessario garantire un'equa allocazione delle risorse, nel rispetto di precisi vincoli economici soprattutto in un momento in cui si è spesso costretti a fare delle scelte ovvero a stabilire delle priorità.

L'allocazione delle risorse, sia la macro che la micro-allocazione, è argomento di notevole rilevanza dal punto di vista etico che nel rispetto dei principi di "giustizia, bontà e imparzialità" si pone l'obiettivo di non introdurre possibili elementi di disuguaglianza e discriminazione di accesso alle cure. Si parla di efficiente allocazione delle risorse quando il valore prodotto dall'investimento in una "opportunità" risulta maggiore del valore che sarebbe prodotto da "opportunità" alternative già disponibili. Poiché le tecnologie innovative ipotizzano maggiori benefici rispetto alla pratica corrente, si rende necessario evidenziare i margini di miglioramento offerti dalla tecnologia sulla pratica assistenziale o clinica.

Particolare attenzione deve essere posta nel decidere il livello di rischio che si è disposti ad accettare quando si investe in una innovazione che, per sua stessa natura, è accompagnata da un certo grado di incertezza, soprattutto in un momento come quello attuale dove la scarsità delle risorse disponibili impone la scelta di priorità per garantire un equo accesso alla tutela della salute pubblica.

Kalipso Chalkidou (1), direttore del *Global Health Policy* (GHP), sintetizza il rischio legato all'innovazione in due categorie:

- rischio di adottare un'innovazione che in futuro non si rivelerà efficace quanto ipotizzato, con conseguente dispendio di risorse;
- rischio di non adottare un'innovazione che in futuro si rivelerà utile, con conseguente perdita di salute.

La valutazione delle tecnologie sanitarie è proprio la complessiva e sistematica valutazione multidisciplinare delle conseguenze assistenziali, economiche, sociali ed etiche provocate in modo diretto e indiretto, nel breve e nel lungo periodo, dalle tecnologie sanitarie esistenti e da quelle di nuova introduzione.

Le tecnologie innovative richiedono talvolta costi elevati che è opportuno sostenere solo dopo avere considerato i reali benefici attraverso percorsi di valutazione che oltre alle caratteristiche tecniche, sicurezza, efficacia clinica, costo-efficacia, includano anche le implicazioni e le ricadute sociali, legali e etiche.

Per evitare di introdurre nuove e complesse tecnologie i cui benefici/rischi possono non essere del tutto noti e per consentire un utilizzo appropriato è necessario disporre di competenze multidisciplinari che sappiano coniugare il sapere scientifico con quello umanistico ispirandosi a forti principi etici e deontologici.

In assenza di principi capaci di guidare le scelte di chi ha la responsabilità di prendersi cura della persona le nuove tecnologie potrebbero porre il rischio di minacciare l'equità di accesso alle cure ed è in questa ottica che si inserisce la riflessione bioetica.

È così lecito parlare di etica applicata alle tecnologie innovative, un'etica che deve coniugare l'equa allocazione delle risorse con principi quali giustizia ovvero la priorità tra le cure necessarie e doverose per ogni malato, responsabilità, beneficenza rispettando contemporaneamente il principio di autonomia.

Il principio della beneficenza dei trattamenti medici, esige la sistematica valutazione dei rischi e dei benefici in maniera tale che i rischi siano adeguatamente giustificati dai benefici attesi (2).

Il principio di giustizia fonda l'obbligo di una giusta distribuzione dei benefici, dei rischi e dei costi nell'erogazione delle risorse sanitarie al fine di evitare discriminazioni (3).

La riflessione bioetica, sollecita l'impegno a riflettere, ragionare e confrontarsi sui benefici e sui limiti di queste opportunità.

Agli inizi degli anni settanta compare per la prima volta l'uso del termine "bioetica". Una prima definizione della Bioetica ci viene data dalla *Encyclopedia of Bioethics*, una prima edizione del 1978 curata da Wilhelm T. Reich. Essa recita così: "studio sistematico della condotta umana nell'ambito delle scienze della vita e della salute esaminata alla luce di valori e di principi morali". A coglierne il messaggio profondo fu l'oncologo Van Rensselaer Potter, nell'articolo "The science of survival" (1970) e con il saggio "Bioethics: bridge to the future" (1971).

Nell'edizione del 1995, Reich dà alla definizione di bioetica una maggiore ampiezza, definendola come "lo studio sistematico delle dimensioni morali – inclusa la visione morale, le decisioni, la condotta, le linee guida ecc. – delle scienze della vita e della salute, con l'impiego di una varietà di metodologie etiche in una impostazione interdisciplinare".

La medicina rigenerativa, l'ingegneria dei tessuti rappresentano la nuova frontiera della biomedicina, con l'obiettivo di riparare o sostituire muscoli, ossa e cartilagini danneggiati da malattie, traumi o anche dal normale processo di invecchiamento. I vantaggi includono l'invecchiamento sano con una riduzione delle spese sanitarie e dei costi socio-economici. La tecnoetica, settore di studi che si occupa del rapporto fra etica e tecnologia, ovvero del "ruolo che hanno i valori nella scelta, nell'utilizzazione e nella diffusione delle tecnologie (Treccani)" permette di esaminare, comprendere e implementare la trasformazione che segue all'applicazione delle tecnologie innovative in sanità.

L'etica applicata alle tecnologie innovative contribuirà a far sì che le numerose possibilità disponibili nel settore sanitario potranno essere efficacemente utilizzate sia per contrastare gli effetti del fisiologico invecchiamento della popolazione, sia per migliorare le procedure diagnostiche e terapeutiche.

Bibliografia

1. Hauck K, Morton A, Chalkidou K *et al.* How can we evaluate the cost-effectiveness of health system strengthening? A typology and illustrations, *Soc Sci Med* 2018;220:141-49.
2. Earl Shelp E *Beneficence and health care*. Berlino: Springer; 1982.
3. Beauchamp TL, Childress J.F. *Principles of biomedical ethics*. New York: Oxford University Press; 1994.

TECNOLOGIE INNOVATIVE E PRATICA QUOTIDIANA: ASPETTI ETICI E MEDICO LEGALI

Maria Sofia Rini

Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Scuola di Medicina, Università degli studi di Bologna

Le recenti acquisizioni tecnologiche, i sofisticati sistemi di diagnostica per immagini, le innovazioni in ambito di materiali e le metodiche di approccio clinico e sperimentale hanno aperto nuove prospettive e creano i presupposti per nuove aspettative.

Prospettive e aspettative che impattano sulla valutazione e sulla percezione dell'attività medica e odontoiatrica (qualità percepita) e producono importanti ricadute in ambito medico-legale e (qualità reale) soprattutto nel contesto della valutazione dell'insuccesso clinico.

I criteri di riferimento valutativo medico-legale sostanzialmente non sono cambiati nel tempo, così come i principi di responsabilità aquiliana o extra-contrattuale e contrattuale. Il contesto clinico e la società, invece hanno subito grandi mutamenti. Mutamenti costanti e continui che influenzano richieste e aspettative, possibilità economiche e di usufruire di quei nuovi mezzi che lo sviluppo delle scienze e delle tecniche produce a vantaggio del bene Salute.

Clinici, ricercatori e cittadini identificano il velocissimo processo di innovazione tecnologica in atto con possibilità incondizionate e infallibili di successo, di guarigione, di risoluzione aprioristica di problematiche, non solo sanitarie, ma anche estetiche e relazionali (ricadute sociali dell'apparire).

L'odontoiatria, branca da sempre esclusa dai livelli essenziali di assistenza e contestualizzata ai margini della Medicina Tradizionale, quasi esclusa dai valori terapeutici, ha assorbito aspettative spesso estranee alla sua reale essenza clinica e funzionale.

Un concetto di branca accessoria, esclusa completamente o quasi dall'SSN (Servizio Sanitario Nazionale), che ha modificato le sue essenze, almeno per quanto globalmente percepito anche attraverso il messaggio pubblicitario e che ha assunto nel tempo grandi valenze estetiche, associate ad aspetti commerciali e di garanzie, impropri in un contesto medico.

L'operato del professionista si scontra quotidianamente tra aspetti etici e deontologici, conoscenze e progresso scientifico e ricadute medico-legali in caso di insuccesso reale o percepito.

Già da tempo l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha esteso il concetto di Salute, identificandolo in uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale, non limitandolo alla semplice assenza di stato di malattia o infermità. Salute psico-fisica, mentale e sociale che coinvolge sempre più prepotentemente il benessere globale dell'individuo attraverso beni diversi, più ampi, come pace, cibo, istruzione, reddito, bellezza e prestanza fisica, ecc. Beni e aspettative che in odontoiatria arrivano a superare il limite del funzionale, il limite della malattia e della necessità di cura, ma che inglobano un concetto di *wellness* e di bellezza indipendenti dalla sussistenza o dal superamento della malattia o dell'infermità.

Oggi star bene non è solo cercare di risolvere o migliorare una condizione di malattia, uno stato patologico, ma significa anche apparire. Il quadro si complica se si considera che molti fattori influenzano lo star bene. Fattori legati alle possibilità di intervento, come, per esempio, le nuove tecnologie, e al supporto umano (*compliance* – co-responsabilità) alla biologia e alla fisiologia. Fattori che non agiscono autonomamente, ma interferiscono vicendevolmente e si

rapportano a entità non sempre controllabili e prevedibili in senso assoluto: la biologia, il singolo individuo, il caso di specie, la reattività individuale, la possibilità di insuccesso.

L'innovazione tecnologica ci ha aperto e continua progressivamente ad aprirci nuove strade e nuove possibilità, ma esistono ancora dei limiti, non superabili al momento, non facili da accettare, ma presenti. Limiti nella ricerca, nella sperimentazione, nella clinica.

Il concetto di Salute, diritto umano e grande risorsa, pertanto, si identifica ancora oggi in aspirazioni, bisogni, necessità, di tutela che non sempre è possibile ottenere, anche con le più sofisticate tecnologie. Le nuove tecnologie, tuttavia, riducendo e controllando le possibilità di errore amplificano da un lato le aspettative e, dall'altro, le necessità di cautela, prudenza, conoscenza di informativa di coloro che delle stesse usufruiscono.

Nel mondo dell'immaginario collettivo tutto è semplice e meccanico. La vendita di Salute *on line* o sui cartelloni pubblicitari, magari a costi irrisori, esclude la possibilità di insuccessi o di costi elevati. Pubblicità ingannevole, non etica, ma pregnante.

Il rapporto tra possibilità tecnologiche ed esiti si sfalda alla luce di consensi viziati, di informative incomplete e troppo semplicistiche. Un'informazione che corre dalla cartellonistica stradale a Internet, a Facebook, a Instagram e che perde il senso del caso concreto e della veridicità scientifica. Informativa che dovrebbe fornire inquadramenti e risposte esaurienti, corretti ed etici, partendo da dati anamnestici e diagnostici concreti.

L'Unione Nazionale Medico Scientifica di Informazione (UNAMSI) nel 2017 ha rivelato come l'88% dei pazienti, dei quali il 22,7% ultra-sessantacinquenni, assuma informazioni sanitarie da Internet, fermandosi nel 44% dei casi alla prima pagina proposta dal motore di ricerca (per cui è stato coniato il termine "Infernet"). Le stesse necessità di salute appaiono mutate, così come le richieste avanzate e le aspettative.

Implantologia, tecniche rigenerative e ricostruttive avanzate, nuovi materiali, anni di studi e di ricerche sminuiti e rapportati a sbiancamenti, piercing, brillantini, ecc. Nessuna differenza, stesse richieste di garanzie. Esigenze e aspettative spesso irrealistiche fonte di lite e contenzioso. Liti e contenziosi non necessariamente conseguenti a errori tecnici o a inidoneità di risultati, ma a errori comunicativi, ad aspettative non soddisfatte. Nasce, così, l'esigenza di superare il mero dato commerciale, supportando l'iniziativa informativa del singolo professionista (informativa corretta, idonea ed etica) e veicolando la ricerca informativa del cittadino verso fonti ufficiali, controllate, affidabili come Università, Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità.

L'odontoiatria racchiude in sé profondi significati psicologici, legati ad aspetti estetici, relazionali, oltre che economici, che coinvolgono etica e deontologia.

Oggi le esigenze clinico-funzionali sono variate e la richiesta di prestazioni si associa a elevate aspettative estetiche.

Aspettative estetiche che si scontrano con una percezione non sempre condivisa e universale di bellezza e che deve tener conto di substrati sociali e culturali diversi, in un contesto socio-sanitario sempre più fragile.

Le necessità di tutela della salute, tuttavia, restano. Necessità che devono tener conto delle innovazioni e dell'obbligo per un professionista della sanità, quale ciascun medico chirurgo e/o medico odontoiatra, di aggiornarsi in materia di nuove acquisizioni medico-scientifiche (Decreto Legislativo 502 del 30 dicembre 1992, articolo 16-bis e 16 ter).

Nuove possibilità e nuovi traguardi, quindi, passano attraverso la conoscenza, le evidenze scientifiche convalidate e la corretta applicazione e trovano, attraverso un etico assolvimento dell'obbligo informativo, possibilità di condivisione con il paziente. Condivisione di rischi e benefici, limiti e possibilità di grandi traguardi attraverso l'applicazione pratica dei frutti di un *iter* di ricerca in continua veloce evoluzione. Limiti e rischi da superare e rimuovere, ma che, comunque, intervengono a condizionare l'attività quotidiana e la stessa ricerca.

L'innovazione tecnologica ha permesso la riduzione dei limiti individuali. Tecnologie innovative, nanotecnologie, misure, riferimenti e dati documentali sempre più precisi, sempre più piccoli, ci hanno aiutato a superare tanti ostacoli, ma non siamo ancora al capolinea. Nonostante la costante e progressiva portata innovativa, non è possibile escludere aspetti semeiotici di diagnosi (sguardo al passato per un ritorno al futuro) che si completano e si integrano con le nuove possibilità tecnologiche. Un medico, un odontoiatra che usa l'innovazione e non si fa usare. Un cittadino paziente che collabora e condivide rischi, scelte ed esiti. Un iter applicativo, realizzativo e di verifica di grosso impatto anche sul mondo biologico e sulla reattività individuale, senza false promesse o falsi miti. I concetti di difesa e tutela dell'atto clinico, sia per chi lo pratica, sia per chi lo riceve, anche in odontoiatria, passano attraverso la conoscenza delle dinamiche, delle forme e dei materiali da scegliere in funzione del "singolo individuo" (su/di misura): anatomia, fisiologia, biologia, chimica, fisica, meccanica, merceologia ecc. Tanto più una microtecnologia è avanzata, tanto più necessita di contestualizzazione, di personalizzazione e verifiche. Richieste e aspettative devono trovare riscontro nell'accettazione della possibilità di questi limiti, che influenzano guarigione ed estetica. Oggi è possibile avere aspettative elevate, ma tali aspettative devono risultare adeguatamente condivise con il paziente attraverso una necessità di consenso che parte da una corretta e adeguata informazione personalizzata. Informativa eticamente idonea a produrre un consenso privo di vizi. Una condivisione scevra di false aspettative o di possibilità di fraintendimenti o fonte di insoddisfazione futura e terreno fertile per contenziosi che, troppo spesso, vedono l'Odontoiatra soccombere. Condivisione documentata, chiara semplice corretta.

Non casuali, pertanto, appaiono i riferimenti al "caso concreto" e "al caso di specie" contenuti nella Legge Gelli, nelle Raccomandazioni in Odontostomatologia e ancor prima nella Legge Balduzzi. Il riferimento alla "sicurezza delle cure", contenuto nel titolo dalla legge 24 marzo 2017, racchiude in sé riferimenti a possibilità terapeutiche in cui le nuove tecnologie rappresentano una porta aperta sul futuro. Ulteriori opportunità sulla base di concreti elementi di tutela: indicazioni, appropriatezza, riferimenti scientifici condivisi, tempi di verifica, idoneità realizzativa, caso di specie, ecc. Elementi che non escludono rischi o eventi indesiderati, ma che concretizzano una riduzione delle possibilità di accadimento.

Nascono, tuttavia, nuovi problemi, nuovi imprevisti e, mentre la scienza continua ad avanzare, nella pratica quotidiana si continua a confrontare e verificare oggetti velocemente sempre più diversi. Il cittadino/paziente deve essere reso edotto anche di questo (informativa e consenso), oltrepassando i limiti del ben e correttamente operare, attraverso un rapporto relazionale (che comunque assume aspetti contrattuali) che amplifica le responsabilità del professionista. Dalla sperimentazione alla clinica: l'etica consiglia condotte prudenti, la norma impone regole precise e scelte condivise, il buon senso consiglia appropriatezza e verifiche. La clinica non può ignorare restrizioni e riferimenti scientifici. La norma deve tener conto del caso di specie e delle eventuali giustifiche documentate (prima dell'evento indesiderato o comunque difforme dalle aspettative). Il buon senso deve condurre a un a corretta gestione dell'eventuale insuccesso. La tutela della Salute e il controllo del contenzioso passano da tutto questo.

Tecnologie, biomateriali, metodiche innovative, elementi artificiali e, comunque, estranei all'organismo, si scontrano inevitabilmente con la biologia e non sempre gli esiti sono meccanicamente determinabili. Alte/altissime probabilità di successo si incontrano e scontrano con le reali aspettative ed esigenze del paziente e con le concrete possibilità realizzative. Norme e requisiti di sicurezza devono essere rispettati e documentati nel contesto di sistemi di qualità, dove nulla è lasciato al caso, dove non si fanno deroghe e compromessi, ma dove, comunque, in particolar modo nel mondo medico-odontoiatrico non si possono promettere risultati certi, anche se ci si impegna a raggiungerli. Ogni promessa è debito, debito che, qualora non assolto o assolto in maniera incompleta o inadeguata, nel contesto di una responsabilità contrattuale in caso di insoddisfazione incide direttamente sulle tasche del professionista. Farsi carico delle proprie

azioni e degli esiti delle stesse, rispondere delle proprie conoscenze e abilità tecniche, delle possibilità e dei limiti intrinseci a ogni scelta terapeutica prima, dopo e durante l'intervento è un dato etico /comportamentale che va oltre le facili promesse di risultato. Rappresenta una concreta obbligazione di professionalità e di etica che come tale deve essere prospettato e comunicato al cittadino/paziente. Rappresenta una tutela del cittadino e del professionista ben oltre alle concrete possibilità realizzative e a qualsivoglia garanzia. Più avanzate sono le tecnologie applicate, più alti saranno i costi, più alte saranno le aspettative e le obbligazioni assunte dal professionista, più attento e puntuale dovrà essere la condivisione informata, senza ignorare restrizioni normative e riferimenti scientifici. L'etica consiglia, la norma impone. La tutela della salute del paziente non ammette deroghe e saldi di fine stagione o applicazioni inappropriate.

L'eccessivo ricorso nella pratica quotidiana all'innovazione tecnologica ha aperto un nuovo problema di dubbia eticità e fonte di riscontro di condotte inidonee e di riconoscimento di colpa medico-odontoiatrica: il *Dental Quackery*. Si tratta dell'individuazione fraudolenta, mediante cosiddette tecniche d'avanguardia, di necessità terapeutiche inesistenti, supportate dal ricorso a tecnologie super-innovative. Si tratta talora di tecniche anche di provata efficacia, ma utilizzate a fini fraudolenti per interventi non necessari, inappropriate, inutili ma costosi, proposti a meri fini di lucro. Interventi talora solo inutili e non invasivi, ma in alcuni casi fonte di alterazioni e lesioni irreversibili. In ogni caso si ravvedono gli estremi per il riconoscimento di condotte professionali colpose.

SEZIONE 2
Biomateriali e rigenerazione tissutale:
ricerca di base

BIOMATERIALI INNOVATIVI, BIOCOMPATIBILI E BIOMIMETICI IN MEDICINA RIGENERATIVA DEL TESSUTO OSSEO

Marco Tatullo

Tecnologica Research Institute, Biomedical Section, Crotone

I biomateriali sono una delle tre principali componenti della medicina rigenerativa, unitamente alla componente cellulare, principalmente di tipo mesenchimale staminale, e ai diversi fattori di crescita con azione induttiva verso processi proliferativi o differenziativi. I biomateriali indubbiamente svolgono oggi un ruolo fondamentale nella medicina riparativa/rigenerativa, ponendosi come “impalcatura”, tecnicamente *scaffold*, per creare quell’humus rigenerativo che supera i limiti del difetto critico; in alternativa, i biomateriali sono veri e propri impianti, con una loro permanenza in situ, con proprietà differenti e dipendenti da innumerevoli fattori locali e sistemici. I biomateriali possono essere naturali o sintetici e vengono utilizzati in applicazioni mediche per supportare, migliorare o sostituire il tessuto danneggiato o in supporto a una specifica funzione biologica (1). I moderni biomateriali combinano in una singola struttura le tecnologie di bioingegneria, di medicina, di biologia cellulare, di fisica e di chimica pertanto si tratta di strutture la cui complessità è andata nel tempo sempre più acuendosi e perfezionandosi. Il filone di ricerca sui biomateriali è cresciuto significativamente nell’ultimo decennio grazie alle recenti scoperte nell’ingegneria dei tessuti, nella medicina rigenerativa e nella protesica multiorgano. Metalli, ceramiche, plastica, vetro e persino costrutti cellulari o tessuti decellularizzati possono essere utilizzati per creare un biomateriale. Possono avere forme semplici o complesse, geometrie adattative, retro-ingegnerizzate, morfologie ottenute con stampanti o lavorate in modo manuale, possono essere con una *texture* superficiale semplice o complessa, con rivestimenti di fibre, di film, di schiume o di composti chimici a legame variabile. L’enorme e mutevole variabilità che caratterizza questi biomateriali, li rende adatti a fungere da supporto in quasi ogni settore della medicina, diventando protagonisti nella protesica con la creazione di valvole cardiache o protesi d’anca, possono essere usati in implantologia dentale o nella creazione di lenti a contatto. In definitiva, i biomateriali sono la soluzione a molte delle richieste che un organismo danneggiato richiede nelle differenti fasi di riparazione e rigenerazione (2).

Che dall’osservazione della natura si possano trarre nuovi spunti per realizzazioni innovative ed ecosostenibili, è un fatto abbastanza risaputo. L’uomo e la natura sono sempre stati interconnessi, l’uomo ha sempre imparato dalla natura; Il termine “Biomimetismo” (*biomimicking*) indica il ripetere artificialmente alcuni processi o prodotti naturalmente disponibili in piante, minerali, animali o fenomeni naturali: “mimando” i meccanismi che governano la natura, si possono trovare sorprendenti risposte anche a complessi dilemmi biologici e ingegneristici.

Il biomimetismo nasce come branca della tecnologia e trae lezioni dalla natura per sviluppare materiali, processi o strutture artificiali, utilizzata, sia in ambito industriale che architettonico; in realtà, è applicato da molti anni nel design industriale, anche se solo nell’ultimo decennio ha conosciuto un rapido sviluppo. Persino la Torre Eiffel è un esempio straordinario di imitazione di qualcosa già esistente in natura. Quando fu costruita pesava un po’ meno di 7.000 tonnellate, e questo risultato lo si ottenne partendo dagli studi sull’anatomia umana di Hermann von Meyer, che concentrò la sua attenzione sulla struttura degli arti inferiori umani, e in particolare, sul modo in cui il femore si articola con la rotula.

Il biomimetismo è anche un fenomeno presente tra specie differenti, un esempio è la similitudine tra le *perikymata* dello smalto dentale, che sono delle scanalature trasversali e ondulate, ritenute le manifestazioni superficiali delle strie di Retzius, le quali ricordano molto le strie ondulate sulle valve dei mitili bivalve, come se rappresentassero delle “impronte digitali” sulle superfici delle strutture caratterizzate da apposizione minerale metacrona.

La evoluzione dei biomateriali è stata molto incalzante, soprattutto negli ultimi anni. In passato si parlava di materiali “non biologici” che si sono poi evoluti in “Biomateriali” e che a loro volta stanno rapidamente evolvendo in materiali funzionalizzati che interagiscono e “parlano” con i tessuti e le cellule nei quali sono impiantati. Dal concetto di integrazione di un materiale biocompatibile all’interno del corpo umano, si è passato al concetto riparazione e poi rapidamente a quello di rigenerazione di tessuti e organi fino ad arrivare al concetto dell’auto rigenerazione (*self-regeneration*). Questa evoluzione dei materiali ha avuto come supporto fondamentale le nanotecnologie. Per nanotecnologie si intendono quelle tecnologie con la “capacità di lavorare a livello atomico, molecolare e anche sub-molecolare, al fine di creare e utilizzare materiali, dispositivi e sistemi con nuove proprietà e funzioni”. Trasponendo sulle nanotecnologie il concetto di “biomimetismo” è facile intuire che si avranno importanti sviluppi nel campo biomedico. Le nanotecnologie biomimetiche sono una futuribile realtà, che prevede l’utilizzo di tecnologie come i nanotubi, capaci di “costruire” *layer-by-layer* degli organi artificiali anche 100 volte più resistenti di quelli umani. Di grande impatto sono anche le nano-pinze, utili per chelare le molecole in uno specifico punto, creando una estrema selettività nelle chirurgie che da “macro” diventano sempre più micro. Un utilizzo ancora più avveniristico lo si ottiene con la nanocibernetica: una scienza nata per sfruttare circuiti applicati alle scienze biomediche, creando, di fatto, ibridi bio-cibernetici totalmente biomimetici e capaci di sviluppare abilità fisiologiche superiori a quelle normalmente sperimentabili. Infine, riferito al campo odontoiatrico, in concetto di nanotecnologie ha permesso di introdurre il concetto di *Nanodentistry*, che è definibile come “la scienza e la tecnologia per la diagnosi, il trattamento e la prevenzione di patologie orali e dentali, che mirano a ridurre, preservare e migliorare la salute orale attraverso materiali nanostrutturati”.

Ovviamente, ogni branca medica ha la potenzialità di sviluppare il ramo “nano”, con relative applicazioni cliniche e chirurgiche, per esempio, da una collaborazione tra il Dr. Tatullo, direttore del “Tecnologica Research Institute”, e il laboratorio del prof. Gaharwar, afferente alla “Texas University”, si sono sviluppati degli *scaffold* nano-ibridi biomimetici e bioattivi che hanno posto una pietra miliare nella terapia della progressione della malattia osteoporotica. L’osteoporosi è una malattia ossea degenerativa comunemente correlata all’invecchiamento (3). Con un aumento delle aspettative di vita in tutto il mondo, la prevalenza della malattia dovrebbe aumentare. Gli attuali trattamenti terapeutici clinici non sono in grado di offrire soluzioni a lungo termine per contrastare la perdita di massa ossea e l’aumentato rischio di fratture, che sono le caratteristiche principali della malattia. Tuttavia, la combinazione di nanomateriali bioattivi all’interno di uno *scaffold* biomimetico mostra lo sviluppo di un promettente trattamento localizzato a lungo termine per le persone affette da osteoporosi.

Il rischio nell’utilizzare le nanotecnologie sta nel fatto che la loro estrema interattività biologica possa risultare, talvolta, nociva. Per esempio, studi condotti sulla rigenerazione ossea hanno evidenziato in alcune coorti un aumento del rischio di fenomeni trombotici e l’incremento dell’incidenza di patologie oncologiche. Restando in ambito ortopedico, alcuni nanofarmaci danno una buona inibizione degli osteoclasti, che tuttavia si scontra con una pressoché totale assenza di osteogenesi, rendendo importante il rischio di fratture patologiche. Infine, numerosi studi sono in corso sugli aspetti legati alla citotossicità a basse dosi: molte criticità derivano dalla scarsità di *Evidence Based Medicine*, pertanto solo il tempo potrà dare risposte meno confuse su queste tecnologie e questi nanomateriali in utilizzi clinici correnti.

Le nanotecnologie quindi hanno permesso di aprire nuove strade per la progettazione di materiali fondamentali per la medicina e odontoiatria rigenerativa. I tre ingredienti fondamentali in odontoiatria/endodonzia rigenerativa sono: la componente cellulare, gli *scaffold*, e i *growth factors*. La componente cellulare maggiormente immaginifica e rappresentativa delle procedure di ingegneria tissutale è rappresentata dalle cellule staminali. La medicina rigenerativa combina vari aspetti della biologia cellulare e molecolare, unitamente alla scienza dei materiali, per riparare o sostituire i tessuti. La chirurgia orale e la chirurgia maxillo-facciale hanno un ruolo primario nel trattamento di malattie traumatiche o degenerative che portano a una perdita di tessuto nei distretti testa-collo: spesso, per riabilitare questi minus tissutali o di organo, è necessario utilizzare tecniche che sono state implementate nel tempo. La frontiera più studiata e verificata clinicamente dalla medicina rigenerativa oggi giorno è rappresentata dalle cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC): le MSC sono senza dubbio il futuro di medicina rigenerativa e stanno mostrando prospettive inimmaginabili solo pochi anni fa (4). Gli studi più recenti mirano alla rigenerazione tissutale utilizzando MSC prelevati da siti ancora più accessibili e ricchi di cellule staminali: la cavità orale si è rivelata un'importante fonte di MSC con il vantaggio di essere facilmente accessibile al chirurgo, evitando così di aumentare la morbilità nei confronti del paziente, come accade nel caso di prelievi in zone poco accessibili e non soggette a sostituzione della parte avulsa. Il futuro è la rigenerazione di interi organi o sistemi biologici costituiti da molti tessuti diversi, a partire da una linea iniziale di cellule staminali, magari utilizzando *scaffold* innovativi insieme alla nanotecnologia dei tessuti biologici.

Oggi giorno, numerosi tipi di MSC sono stati isolati dai denti: nel 2000 le MSC sono state inizialmente isolate da Gronthos *et al.* dalla polpa dentale (*Dental Pulp Stem Cell*, DPSC) (5). Queste cellule possiedono caratteristiche fenotipiche simili a quelle delle cellule contenute nel midollo osseo (*Bone Marrow Stem Cells*, BMSC) e hanno le proprietà staminali tipiche come la capacità di rigenerarsi autonomamente e la capacità di multi-differenziare nei tre foglietti embrionali. Inoltre, le DPSC hanno mostrato abilità di differenziare e rigenerare anche tessuti non orofacciali, infatti, queste cellule sono state differenziate in epatociti, in neuroni, nelle isole pancreatiche, nei miociti e nei cardiomiociti. Successivamente, le MSC sono state isolate anche nella polpa dentale di denti decidui esfoliati umani (*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous*, SHED) (6). Queste SHED, come le DPSC, hanno la capacità di differenziare *in vitro* in odontoblasti, osteoblasti, adipociti e cellule simili a neuroni (neuron-like cells). Anche le SHED sono state in grado di formare dentina e osso quando impiantate unitamente a *scaffold* osteogenici in modelli in-vivo.

Il legamento parodontale è un'altra fonte di MSC da tessuti adulti, presenti nel distretto orodentale. Le cellule staminali del legamento parodontale (*Periodontal Ligament Stem Cells*, PDLSC) hanno la capacità di rigenerare i tessuti parodontali come il cemento, il legamento parodontale e l'osso alveolare.

Ulteriori MSC sono state anche isolate dai tessuti dentali presenti transitoriamente durante lo sviluppo dell'abbozzo dentario: il follicolo dentale (*Stem Cells from Dental Follicle*, DFPC) e la papilla apicale, per esempio, sono ricchi di queste preziose cellule rigeneratrici. Le DFPC hanno mostrato la capacità di rigenerare i tessuti parodontali prevalentemente, mentre le SCAP (*Stem Cells from Apical Papilla*) dimostrano una migliore proliferazione e una migliore capacità di promuovere la rigenerazione della matrice della dentina quando impiantate in topi immunocompromessi rispetto a DPSC.

Le BMSC non sono cellule staminali facilmente ottenibili per motivi di limitata accessibilità ed elevata dolorabilità. Al contrario, i tessuti dentali e oro-maxillo-facciali sono le fonti di cellule staminali più accessibili. Tuttavia, l'isolamento delle MSC da queste fonti potrebbe richiedere l'estrazione di un dente sano. Inoltre, non tutti gli adulti hanno bisogno dell'estrazione dei denti del giudizio per motivi odontoiatrici o funzionali. Per superare questi limiti, recentemente,

Marrelli *et al.* hanno dimostrato che le MSC isolate da cisti periapicali (*human Periapical Cyst-Mesenchymal Stem Cells*, hPCy-MS) hanno un profilo immunofenotipico caratteristico delle cellule staminali mesenchimali e hanno mostrato la capacità di differenziarsi nelle linee osteogenica e adipogenica e condrogenica (7). Le cisti periapicali sono un reperto facilmente ottenibile, enucleabile da pazienti con disagio minimo: esso sembra essere una promettente fonte di cellule staminali adulte, con ottime capacità di corroborare procedure cliniche in odontoiatria e chirurgia maxillo-facciale. In effetti, le hPCy-MS similmente alle DPSC hanno comune derivazione dalle creste neurali, ed esprimono spontaneamente le proteine specifiche dei neuroni e degli astrociti, e i geni correlati al fenotipo neurogenico nel loro stato basale. Inoltre, le hPC-MS, sotto appropriata stimolazione pro-neurogenica, acquisiscono morfologia neuronale e sovra-esprimono significativamente diversi marcatori neurali, sia a livello proteico che a livello del trascritto primario (8).

La scelta delle cellule staminali adatte trova il suo maggiore impatto con lo *scaffold* più performante, creando in tal modo una eccellente nicchia cellulare.

Gli *scaffold* devono essere assolutamente biocompatibili, e costituire un supporto alla crescita cellulare, possibilmente seguendo le morfologie di sviluppo del tessuto da riparare/rigenerare nelle 3 dimensioni. Essi hanno un ruolo sia passivo, di “impalcatura” e supporto alla rigenerazione, sia un ruolo attivo e dromotropo nella rigenerazione tissutale; inoltre, lo *scaffold* funge da scambiatore di sostanze trofiche, permettendo la sopravvivenza cellulare. Per definizione, gli *scaffold* devono degradare nel tempo la loro struttura, per essere lentamente sostituiti dal tessuto rigenerato.

Le tecnologie di ingegneria diretta e inversa sono oggi molto evolute, creando numerose combinazioni possibili relative alla produzione di *scaffold custom-made*. La tecnologia più innovativa che attualmente può essere utilizzata è il *3D-bioplotting* che permette di avere un’architettura prestabilita e regolare che crea *scaffold* ingegnerizzati con filamenti e pori che presentano una precisione nanometrica.

In letteratura esistono molte forme e composizioni relative agli *scaffold* biomedici: quelli iniettabili sono un mix tra componente solido/particellare e componente liquida. Gli *scaffold* liquidi hanno vantaggi relativi alla manipolabilità, inoltre hanno proprietà meccaniche molto surgeon-friendly, riuscendo a indurirsi entro 15min dalla applicazione nel sito chirurgico.

Lo *scaffold* ideale tende a essere sempre più “self”, in modo da avere maggiori possibilità di integrazione fisiologica: gli *scaffold* a base di matrice extracellulare (ECM) sono una eccellente soluzione ai principali limiti presenti negli *scaffold* più innovativi. Per esempio, gli idrogels derivati dalla matrice extracellulare bovina (*bovine ExtraCellular Matrix*, bECM), producono una morfologia a consistenza gelatinosa capace di accogliere cellule osteocitarie che mantengono la osteoconduttività e che possono essere utilizzati per il riparo e la ricostruzione di numerosi tessuti.

Lo *scaffold* è caratterizzato da una macro- ma anche da una micro-architettura: l’*équipe* del dr. Tatullo ha lavorato e brevettato una tipologia di *scaffold* 3D molto innovativi, creati in collaborazione con la Università di Nottingham: questi *scaffold* 3D rappresentano un esempio di microarchitettura funzionale, che permette il *drug-release* in modo controllato nel tempo. Gli *scaffold* 3D sono stati fabbricati utilizzando delle micro particelle di PLGA (*Poly d,l-Lactic-co-Glycolic Acid*), che si ottengono unendo il PLGA con diclorometano e successivamente con alcol polivinilico. Gli acidi polilattico (*PolyLactic Acid*, PLA), poliglicolico (*PolyGlycolic Acid*, PGA) e i loro copolimeri (PLGA) sono biomateriali dotati di ottima biocompatibilità ed elevato tasso di biodegradabilità. La degradazione di tali polimeri è rapida e avviene principalmente per idrolisi: si ottiene la produzione di monomeri quali acido lattico e acido glicolico, che vengono successivamente metabolizzati nei normali processi fisiologici del corpo umano, data la naturale presenza di questi monomeri nell’organismo. In aggiunta, essi hanno grande versatilità di forma e trama, specialmente nella ricostruzione di grandi difetti sul piano tridimensionale.

La realizzazione di nuovi prodotti protesici composti con copolimeri di PGA e PLA, finalizzati all'uso medicale nella chirurgia ricostruttiva/rigenerativa, si presta a creare innovazione anche nei settori della chirurgia ortopedica e orale.

Tra gli *scaffold* innovativi a maggiore impatto nella microchirurgia, sono di grande interesse i *Self-Assembling Peptides* (SAP).

I SAP derivano dalla spontanea associazione di molecole, sotto un determinato equilibrio, in aggregati strutturali ben definiti e uniti da legami non covalenti. Essendo tuttavia gli *scaffold* auto-assemblanti SAP piuttosto fragili, si è reso necessario l'utilizzo di una tecnica di produzione vicariata dalle nanotecnologie: l'elettrofilatura (*electro-spinning*); l'*elettrospinning* serve per sintetizzare e caratterizzare dei nuovi *scaffold* composti da micro e nano fibre di polimeri quali acido poli-lattico e poli-caprolattone. L'elettrofilatura è una tecnica che consente la produzione di *scaffold* elettrofilati con fibre continue aventi diametri da alcuni micron fino a pochi nanometri.

Tra le varianti degli *scaffold*, sono molto discussi in letteratura i derivati da concentrati piastrinici, i quali possono essere classificati come "biomatrici". Gli esempi maggiormente riportati in biomedicina sono: il PRP (*Platelets-rich Plasma*) e il PRF (*Platelets-rich Fibrin*), tra questi, notevole interesse lo ha riscontrato il PRF. Il PRF negli studi in-vitro e in-vivo ha mostrato di avere la capacità di regolare l'infiammazione locale, di stimolare la chemiotassi immunitaria, di promuovere la stabilità del coagulo e di accelerare il timing di guarigione della ferita chirurgica. Infine, in associazione con innesti ossei, il PRF sembra accelerare la formazione di nuovo osso e sembra migliorare la vascolarizzazione dei tessuti molli sovrastanti. (9)

Come concetti innovativi associati agli *scaffold*, troviamo il concetto della "multipotenza" sviluppato anche dal team del dr. Tatullo in una collaborazione con il team della UPMC di Parigi. La multipotenza degli *scaffold* è un concetto applicabile a ogni tessuto. Gli *scaffold* acellulari dei muscoli scheletrici (*Muscle Acellular Scaffold*, MAS), per esempio, sono stati prodotti, innestati e colonizzati da cellule muscolari in un sito a interfaccia tra osso e muscolo, evidenziando l'importanza dell'ambiente nel dirigere l'*homing* e il differenziamento cellulare. I risultati dello studio svolto dal team Tecnologica Research Institute e UPMC rivelano la multipotenza dei MAS e indicano il potenziale di questa nuova tecnica come uno strumento prezioso nella rigenerazione del tessuto muscolo-scheletrico (10, 11).

Infine, una importante linea generale di ricerca è quella di catalizzare la rigenerazione verso quei fenotipi più ostici da ottenere, come quelli relativi al sistema nervoso centrale: questa linea di ricerca è stata percorsa dal team del Dr. Tatullo, il quale ha utilizzato il citotipo innovativo rappresentato dalle hPCy-MSC. In un recente studio pubblicato sul *Journal of Dental Research*, il team del Dr. Tatullo ha dimostrato per la prima volta che le hPC-MSC hanno una predisposizione verso il fenotipo neuronale, tale predisposizione viene incentivata se le hPCy-MSC vengono esposte a stimoli induttivi verso il fenotipo neuronale, grazie alla up-regolazione di un set completo di proteine e geni che caratterizzano le cellule neuronali. In conclusione, i risultati di questo studio hanno creato i presupposti per ipotizzare terapie basate su cellule staminali differenziate, finalizzate al trattamento di malattie neurologiche. Questa ricerca, ha posto le basi per riutilizzare parte delle cisti dentali, un comune reperto patologico destinato a essere stoccato nei rifiuti biologici, per reperire cellule staminali, che poi andremo a trasformare in neuroni dopaminergici capaci di produrre melanina, esattamente gli stessi neuroni che vengono attaccati nel Morbo di Parkinson: in questo modo, possiamo pensare a un futuro utilizzo di questi modelli sperimentali in *trial* terapeutici innovativi.

Bibliografia

1. Tatullo M, Marrelli M, Paduano F. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci* 2015;12(1):72-7.
2. Tatullo M, Marrelli M, Falisi G, *et al.* Mechanical influence of tissue culture plates and extracellular matrix on mesenchymal stem cell behavior: A topical review. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2016;29(1):3-8.
3. Barry M, Pearce H, Cross L, Tatullo M, Gaharwar AK. Advances in nanotechnology for the treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2016;14(3):87-94.
4. Tatullo M, Falisi G, Amantea M, Rastelli C, Paduano F, Marrelli M. Dental pulp stem cells and human periapical cyst mesenchymal stem cells in bone tissue regeneration: comparison of basal and osteogenic differentiated gene expression of a newly discovered mesenchymal stem cell lineage. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015;29(3):713-18.
5. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. *Postnatal human dental pulp stem cells (dpSCs) in vitro and in vivo.* Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 2000;97:13625-30.
6. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:5807-812.
7. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties. *Int J Biol Sci* 2013;9(10):1070-8.
8. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Human periapical cyst-mesenchymal stem cells differentiate into neuronal cells. *J Dent Res* 2015;94(6):843-52.
9. Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S, Dipalma G, Pacifici L, Inchingolo F. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci* 2012;9(10):872-80.
10. Aulino P, Costa A, Chiaravalloti E, *et al.* Muscle extracellular matrix scaffold is a multipotent environment. *Int J Med Sci* 2015;12(4):336-40.
11. Perniconi B, Coletti D, Aulino P, *et al.* Muscle acellular scaffold as a biomaterial: effects on C2C12 cell differentiation and interaction with the murine host environment. *Front Physiol* 2014;5:354.

IDROGELI A BASE PEPTIDICA: NUOVI BIOMATERIALI PER L'INGEGNERIA TISSUTALE

Laura Chronopoulou
Dipartimento di Chimica, Università La Sapienza, Roma

In questa lezione sono stati presentati alcuni concetti di base e alcuni trend della ricerca sugli idrogeli compositi per applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale.

Un materiale composito è un materiale eterogeneo costituito da due o più componenti con caratteristiche chimico-fisiche differenti, che, una volta combinate, formano un materiale con caratteristiche nuove e possibilmente migliorate. Alcuni esempi molto noti di materiali compositi sono l'asfalto, il cemento, la vetroresina, ma anche materiali presenti in natura come il legno, costituito da fibre di cellulosa disperse in una fase di lignina, e le ossa stesse.

Gli idrogeli sono invece sistemi colloidali costituiti da due componenti: una componente solida, quale per esempio un reticolo polimerico, e una componente liquida che, nel caso degli idrogeli, è l'acqua. Se l'organizzazione strutturale della componente solida si basa su interazioni di tipo non covalente, cioè interazioni di tipo fisico, l'idrogel che ne deriva viene definito un gel fisico; oppure, se tra le componenti solide del gel vi sono legami chimici, il gel si definisce un gel chimico. Le particolarità e le potenzialità applicative degli idrogeli, soprattutto nell'ambito delle biotecnologie, derivano dal loro altissimo contenuto di acqua, che può infatti costituire più del 90% dell'idrogel. L'elevato contenuto di acqua conferisce a questi materiali innanzitutto una buona biocompatibilità e li rende molto simili ai tessuti biologici.

Gli idrogeli sono presenti anche in natura, per esempio l'agar agar o alcuni polisaccaridi. Il meccanismo classico di gelazione prevede il *crosslinking* di catene polimeriche, tuttavia di recente è emersa la possibilità di ottenere dei geli anche a partire da piccole molecole, chiamate idrogelatori, in grado, in virtù delle loro proprietà chimico-fisiche, di autoassemblarsi intrappolando al loro interno grandi quantità di acqua (1).

Gli idrogeli sono biocompatibili e, se pensiamo a gel a base polisaccaridica o peptidica, essi sono anche biodegradabili. Le catene polimeriche presenti nei gel formano reticoli tridimensionali che possono mimare l'organizzazione e anche alcune funzioni della matrice extracellulare. Gli idrogeli inoltre sono caratterizzati dalle loro proprietà meccaniche e sono dei materiali viscoelastici. Tuttavia, spesso le proprietà meccaniche dei gel risultano essere insufficienti per alcune applicazioni ma tali proprietà meccaniche possono essere migliorate, utilizzando diverse strategie. Si può agire per esempio sulla concentrazione polimerica. È intuitivo come aumentando tale concentrazione aumenti anche la forza del gel. Si può inoltre agire sulla porosità o aumentare il grado di reticolazione, entro certi limiti. Un'ulteriore strategia è l'utilizzo di *filler*, materiali che dispersi all'interno del gel lo rinforzano meccanicamente, dando origine a tutti gli effetti a materiali di tipo composito. La preparazione di idrogel compositi è utile per poter conferire al gel anche altre proprietà. Esistono diversi tipi di filler che possono essere utilizzati e probabilmente i più interessanti a oggi sono i materiali nanostrutturati.

Questi sono materiali che hanno almeno una dimensione nella scala dei nanometri, che è la stessa scala dimensionale delle macromolecole biologiche. È ormai stato ampiamente dimostrato come i nanomateriali, in virtù delle loro dimensioni, siano in grado di interagire con i sistemi biologici.

Per quanto riguarda la realizzazione di idrogeli compositi con materiali nanostrutturati, questi possono avere tre tipi di composizione diversi: nel primo caso il composito è formato da micro o

nanogel che stabilizzano nanoparticelle di vario tipo. Nel secondo caso si può avere un idrogel al cui interno sono disperse le nanoparticelle, che interagiscono con la matrice del gel attraverso interazioni di tipo non covalente. Nel terzo caso invece le nanoparticelle sono legate mediante legami chimici di tipo covalente alla componente solida del gel (2).

È essenziale che le nanoparticelle vengano disperse il più omogeneamente possibile all'interno del gel, perché le proprietà del materiale composito risultino omogenee. A questo scopo finora sono state usate 5 principali strategie sintetiche. Nel primo caso si ha la formazione dell'idrogel nella sospensione delle nanoparticelle. Nel secondo caso le nanoparticelle vengono inserite all'interno dell'idrogel dopo la sua formazione. Nel terzo caso le nanoparticelle si formano a partire da precursori all'interno di un gel preformato. Nel quarto caso le nanoparticelle vengono utilizzate per reticolare i precursori dell'idrogel e far avvenire la gelazione. Infine è stata riportata la formazione del gel a partire da nanoparticelle, polimeri e gelatori distinti che sono responsabili della gelazione (2).

La sinergia tra idrogeli e materiali nanostrutturati può apportare nuove e interessanti proprietà ai materiali compositi che ne derivano. Vediamo ora quali sono i tipi di nanomateriali utilizzati in combinazione con gli idrogeli per applicazioni di tipo biotecnologico. Iniziamo con le nanoparticelle metalliche. Le più utilizzate sono le nanoparticelle di argento, per le loro note proprietà antibatteriche. Anche le nanoparticelle di oro (Au) sono molto studiate, nonostante abbiano un costo elevato, perché permettono di ottenere materiali conduttori. Inoltre se il materiale composito contenente Au viene irraggiato utilizzando una radiazione che abbia la lunghezza d'onda corrispondente al picco plasmonico dell'Au, questa radiazione viene assorbita dall'Au riscaldando localmente il materiale e questo riscaldamento può essere controllato e sfruttato per esempio per innescare il rilascio di molecole bioattive contenute nel gel. Vengono utilizzate, in misura minore, anche nanoparticelle di altri metalli. Sono inoltre molto utilizzate le nanoparticelle di ossidi metallici, in particolare gli ossidi di Fe per le loro proprietà magnetiche, anch'esse utili in medicina. Per quanto riguarda le nanoparticelle non metalliche, i materiali più studiati sono quelli a base di carbonio e silicio, inclusi l'ossido di grafene e i nanotubi di carbonio (C), che, nonostante non siano degradabili, sono tuttavia oggetto di studio per le loro proprietà meccaniche, elettriche, termiche e ottiche. Infine tra i nanomateriali più utilizzati e che pongono minori problemi riguardo a sicurezza, biocompatibilità e biodegradazione, vi sono i nanomateriali polimerici, tra cui troviamo le micelle e i liposomi, che sono entrambi formati da molecole anfipatiche. Altri tipi di nanomateriali sono i nanogel, i dendrimeri, le particelle *core-shell* e quelle con strutture iperramificate.

Nel caso di uno *scaffold* iniettabile la soluzione dei precursori dello *scaffold* viene mischiata a opportune molecole e/o cellule e iniettata nel tessuto bersaglio. *In vivo* i precursori sono in grado di autoassemblarsi, in risposta alle condizioni chimico-fisiche che incontrano in questo ambiente, quale il pH, la forza ionica, l'azione di enzimi endogeni o altro, generando l'architettura dello *scaffold*. Lo *scaffold* a questo punto deve indurre la riparazione del tessuto interagendo con le cellule impiantate oppure stimolando la migrazione e il differenziamento di cellule endogene. Lo *scaffold* inoltre deve supportare l'integrazione, la proliferazione e il differenziamento della tipologia cellulare bersaglio. Gli idrogeli compositi sono studiati per essere utilizzati come *scaffold* in questo tipo di applicazioni.

Le proprietà meccaniche degli *scaffold* a base di idrogeli sono in genere inferiori a quelle dei tessuti, per cui è importante trovare strategie valide per produrre idrogeli sufficientemente forti e resistenti da impiegare nelle applicazioni di ingegneria tissutale. La presenza di una microstruttura fibrosa in genere permette ai tessuti di possedere sufficiente forza, rigidità e resistenza. L'introduzione di nanofibre all'interno degli idrogel potrebbe mimare efficacemente il microambiente cellulare. In uno studio recente sono stati impiegati due polimeri naturali ampiamente disponibili, la gelatina e l'alginato, per produrre idrogeli compositi multistrato (3).

Inizialmente sono state prodotte delle nanofibre di gelatina tramite la tecnica dell'*elettrospinning* in cui un getto polimerico viene filato all'interno di un campo elettrico elevato. Con questa tecnica sono stati preparati diversi strati di fibre con orientamenti definiti e questi strati sono stati impilati e reticolati tramite reticolazione chimica con EDC (1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide) e NHS (N-idrossisuccinimmide). Gli strati di nanofibre reticolate di gelatina sono stati quindi posti in una soluzione acquosa di alginato. L'alginato è in grado di gelare in presenza di ioni calcio, per cui solo quando alla soluzione di alginato, contenente anche le fibre di gelatina, viene fornito CaCl_2 (cloruro di calcio) si forma il gel, che viene a sua volta reticolato.

Secondo questo schema sono stati preparati diversi compositi con microstrutture diverse dovute al diverso allineamento delle fibre nei vari strati. L'allineamento delle fibre in uno strato può essere del tutto casuale, oppure le fibre possono essere allineate con diverse angolazioni. I vari strati, a loro volta, possono essere impilati imponendo lo stesso allineamento delle fibre, oppure con diverse angolazioni. Gli autori hanno studiato come questa microstruttura influenzi le proprietà meccaniche del materiale. Hanno sottoposto i vari materiali a diversi tipi di fratture e hanno misurato alcuni parametri quale la forza di rottura, cioè il limite di sollecitazione esterna che può essere applicata, oltre il quale il materiale si rompe. Quindi maggiore è la forza di rottura maggiore è la resistenza del materiale. I risultati dimostrano come la microstruttura del materiale sia in effetti decisiva nel determinarne la resistenza. In particolare, il materiale che si è dimostrato più resistente possiede un allineamento delle fibre ben definito, parallelo alla direzione della sollecitazione. Per quanto riguarda i materiali multistrato, bisogna tenere conto che spesso nelle applicazioni il materiale deve resistere a sollecitazioni multidirezionali.

Tra i materiali più utilizzati per preparare idrogeli ci sono gli idrogelatori di tipo peptidico. I principali vantaggi dell'utilizzo di peptidi per creare materiali avanzati sono innanzitutto la loro biodegradabilità e biocompatibilità. Inoltre, i peptidi sono facilmente funzionalizzabili e possono assumere strutture secondarie ordinate, quali alfa eliche e foglietti beta, che sono efficacemente riconosciute dai sistemi cellulari. Inoltre, le attuali tecniche di sintesi peptidica in fase solida consentono di ottenere qualsiasi tipo di sequenza di interesse e con rese elevate. Anche sequenze peptidiche molto corte, di 2 o 3 residui, opportunamente funzionalizzate, possono autoassemblarsi intrappolando grandi quantità di acqua a dare idrogeli.

In un recente studio è stato preparato un idrogel composito utilizzando un tripeptide aromatico e nanotubi di C (4). I nanotubi di C sono materiali molto interessanti per diverse applicazioni tecnologiche e in questo caso per le loro proprietà meccaniche. È interessante notare che da soli i nanotubi si aggregano in soluzione acquosa, mentre in presenza del tripeptide vengono dispersi. Dalle immagini SEM (*Scanning Electron Microscopy*), dei gel compositi è evidente come i nanotubi formano dei collegamenti tra le fibre peptidiche. Questa microstruttura ha delle conseguenze molto interessanti sulle proprietà del gel. Sono stati infatti eseguiti dei test in cui il gel sono stati sottoposti a stress crescenti fino alla loro rottura. Nel campione di gel tal quale, aumentando lo stress esercitato a un certo punto il gel si rompe, ciò è testimoniato dal crollo del modulo elastico e del modulo viscoso. A questo punto il valore del modulo viscoso supera quello del modulo elastico e ciò, a livello fisico, indica che siamo in presenza di una soluzione. Il comportamento del composito è differente. Innanzitutto partiamo da valori del modulo elastico più alti, che vuol dire che il gel ha proprietà meccaniche migliorate grazie alla presenza dei nanotubi di C. Sottoposto a sollecitazioni via via crescenti il gel resiste molto di più. A un certo punto si rompe ma a quel punto recupera in gran parte, quindi ha la capacità di rigenerarsi.

Parliamo ora più in particolare di applicazioni nella rigenerazione ossea. Sappiamo bene come l'osso sia una struttura piuttosto complessa costituita principalmente da collagene e cristalli di idrossiapatite e da diversi tipi di cellule. In sostanza l'osso è a tutti gli effetti un materiale composito.

Oggi la frontiera della medicina è la rigenerazione dei tessuti, cioè la strategia, altamente innovativa, in presenza di un danno a un tessuto, di agire non per riparare il danno ma per stimolare la capacità dei tessuti di autorigenerarsi. Questa è una strategia potente ma complessa, che si avvale di 3 elementi chiave (lo *scaffold*, le cellule e i fattori di crescita).

Diversi materiali possono essere usati per costruire gli *scaffold*. Il chitosano per esempio è un materiale molto studiato (5). Il chitosano è un polisaccaride che deriva dalla deacetilazione della chitina, il componente dell'esoscheletro dei crostacei, che è uno dei materiali più disponibili in natura a basso costo ed è un materiale che produce idrogeli.

Le principali tecniche per produrre *scaffold* di chitosano sono basate sulla liofilizzazione e gelazione e il *salt leaching*, ma anche l'*elettrospinning* e la stampa 3D, che permettono di preparare *scaffold* costituiti da fibre e controllarne l'orientamento e l'impacchettamento.

Gli *scaffold* devono possedere diverse proprietà. Queste proprietà possono essere modulate attraverso l'aggiunta di altri polimeri o materiali ceramici al chitosano. La porosità è necessaria per l'infiltrazione delle cellule all'interno dello *scaffold*, la loro adesione e la secrezione di matrice extracellulare. L'adesione cellulare dipende dalle dimensioni dei pori dello *scaffold* e le cellule sono in grado di discriminare tra sottili variazioni della matrice extracellulare, che ne influenzano il comportamento. L'impianto *in vivo* di uno *scaffold* risulta nell'assorbimento di acqua da parte dello *scaffold* dai tessuti circostanti, con un rigonfiamento dello *scaffold* e un aumento delle dimensioni dei pori. Un rigonfiamento eccessivo può però portare al distacco dello *scaffold* dal sito di impianto. Un rigonfiamento insufficiente impedisce invece l'interazione con le cellule. Il rapido assorbimento di proteine sullo *scaffold* può essere necessario per l'interazione del biomateriale con le cellule. Le proteine adsorbite possono infatti influenzare l'adesione cellulare e altri comportamenti. La biomineralizzazione si riferisce alla deposizione di ioni e minerali sulla superficie degli *scaffold* esposti ai fluidi biologici. La deposizione di CaP (fosfato di calcio) stimola l'attività degli osteoblasti. La capacità di biomineralizzazione di uno *scaffold* viene misurata esponendolo a fluidi biologici simulati e valutando la formazione di CaP. I compositi a base di chitosano hanno mostrato una maggiore biomineralizzazione rispetto al solo chitosano. L'inserimento di nanoparticelle aumenta l'area superficiale fornendo un maggior numero di centri di nucleazione per la formazione di idrossiapatite. La biodegradazione si riferisce ai processi chimici che intervengono per rompere il biomateriale *in vivo*. I materiali impiantati dovrebbero essere degradati nel tempo in sincronia con la formazione di nuovo osso. Il chitosano è degradato principalmente dal lisozima. Gli *scaffold* per la rigenerazione ossea devono possedere proprietà meccaniche adeguate per il loro utilizzo, che corrispondano a quelle del tessuto in cui vengono impiantati. Le proprietà meccaniche dell'osso naturale dipendono dal tipo di tessuto, quale l'osso corticale piuttosto che l'osso spugnoso. Diversi studi hanno evidenziato uno stretto rapporto tra rigidità dello *scaffold* e comportamento cellulare. Per esempio ne viene influenzato il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali. Le proprietà meccaniche del chitosano possono essere classificate come medio-basse, tuttavia l'uso di altri polimeri o nanoparticelle può migliorarle. Diversi *scaffold* compositi a base di chitosano sono stati utilizzati anche in studi *in vivo* in modelli animali.

Nelle applicazioni *in vivo* bisogna tenere conto dei numerosi meccanismi biologici che possono modificare la struttura dei biomateriali e quindi comprometterne le applicazioni (6). Per esempio si può avere la degradazione del biomateriale in seguito all'azione di enzimi endogeni. La biodegradazione, sebbene auspicabile, non deve avvenire in tempi troppo brevi. Inoltre, sul biomateriale possono adsorbirsi proteine solubili o vi si può depositare nuova matrice extracellulare, tutti fattori che vanno studiati attentamente e considerati sin dalla progettazione del biomateriale stesso. Di fondamentale importanza per lo sviluppo di future applicazioni cliniche è la valutazione di risposte infiammatorie e/o immunitarie del sistema ospite in seguito all'interazione con il biomateriale.

Bibliografia

1. Yang Z, Xu B. Using enzymes to control molecular hydrogelation. *Advanced Materials* 2006;18,3043-046.
2. Thoniyot P, Tan MJ, Karim AA, Young DJ, Loh XJ. Nanoparticle–Hydrogel composites: concept, design, and applications of these promising, multi-functional materials. *Advanced Science* 2015;2:1400010-23.
3. Tonsomboon K, Butcher AL, Oyen ML. Strong and tough nanofibrous hydrogel composites based on biomimetic principles. *Materials Science and Engineering C* 2017;72:220-7.
4. Iglesias D, Melle-Franco M, Kurbasic M, Melchionna M, Abrami M, Grassi M, Prato M, Marchesan S. Oxidized nanocarbons-tripeptide supramolecular hydrogels: shape matters! *ACS Nano* 2018;12:5530-8.
5. Saravanan S, Leena RS, Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016;93:1354-65.
6. Collier JH. Modular self-assembling biomaterials for directing cellular responses. *Soft Matter* 2008; 4:2310-5.

PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI PER LA RIGENERAZIONE TISSUTALE

Laura Chronopoulou

Dipartimento di Chimica, Università La Sapienza, Roma

L'autoassemblaggio è una strategia ampiamente presente nei sistemi biologici che può essere sfruttata tecnologicamente per la preparazione di materiali funzionali. L'autoassemblaggio può essere indotto da uno stimolo esterno di natura chimica, fisica o biologica. Per esempio, un enzima può indurre l'autoassemblaggio agendo su precursori opportuni tramite la formazione oppure la rottura di un legame chimico, con conseguente formazione di un "idrogelatore" in grado di autoassemblarsi in acqua a formare strutture predefinite. Uno dei primi esempi riportati in letteratura in questo campo è la sintesi di tripeptidi aromatici Fmoc-protetti in fase acquosa (1). I principali vantaggi dell'utilizzo di peptidi per creare materiali avanzati sono innanzitutto la loro biodegradabilità e biocompatibilità. Inoltre, i peptidi sono facilmente funzionalizzabili e possono assumere strutture secondarie ordinate che sono efficacemente riconosciute da sistemi cellulari. Inoltre, le attuali tecniche di sintesi peptidica in fase solida consentono di ottenere qualsiasi tipo di sequenza di interesse e con rese elevate.

Idealmente, per l'applicazione di peptidi autoassemblanti in rigenerazione tissutale, la soluzione dei peptidi dovrebbe essere mischiata a opportune molecole e/o cellule e introdotta nel tessuto bersaglio. In seguito all'assemblaggio il biomateriale deve indurre la riparazione del tessuto interagendo con le cellule impiantate oppure stimolando la migrazione e il differenziamento di cellule endogene. Lo *scaffold* inoltre deve supportare l'integrazione, la proliferazione e il differenziamento della tipologia cellulare bersaglio (2).

Tra le famiglie di peptidi maggiormente studiate per applicazioni di rigenerazione tissutale rivestono un ruolo fondamentale i peptidi a base di forcine beta e quelli della famiglia EAK-16.

I peptidi a base di forcine beta sono caratterizzati dall'alternanza di residui carichi positivamente e residui idrofobici nella loro sequenza amminoacidica (3). Inoltre, nella loro struttura è presente un tetrapeptide contenente un D-amminoacido. La struttura secondaria di tale famiglia di peptidi è quella delle forcine beta. In condizioni opportune, tali peptidi formano dei gel, che risultano essere pH-dipendenti, termoreversibili e dipendenti dalla forza ionica. Le proprietà del gel possono essere modulate variando la struttura primaria del peptide (4). Tali materiali sono stati funzionalizzati con una sequenza peptidica in grado di controllare la formazione di calcio fosfati in soluzione. In seguito all'azione della fosfatasi alcalina, all'interno del gel è stata osservata la deposizione di materiale altamente cristallino, dimostrando che il peptide funzionalizzato è in grado di stimolare la biomineralizzazione (5).

I peptidi della famiglia EAK-16 hanno una sequenza amminoacidica in cui ad amminoacidi idrofobici si alternano amminoacidi carichi. Essi sono in grado di autoassemblare in soluzione fisiologica, grazie a interazioni intercatena che generano strutture a foglietti beta (6). In uno studio recente, il peptide autoassemblante (RADA)₄ è stato funzionalizzato con tre diverse sequenze presenti in 2 proteine della membrana basale (laminina I e collagene IV), che promuovono l'adesione di cellule endoteliali, la loro diffusione e la formazione di tubuli (7).

Cellule endoteliali da aorta umana, seminate sui diversi *scaffold*, sono state in grado di mantenere il fenotipo endoteliale e di formare dei monolayer sugli *scaffold* funzionalizzati.

Della famiglia di peptidi autoassemblanti EAK-16 fa parte anche il PuraMatrix®, studiato e brevettato nel 1993 all'MIT. Questo peptide, che forma un gel perfettamente trasparente, è

biocompatibile e biorisorbibile. Attualmente, è in fase di approvazione come emostatico chirurgico sia in Europa che negli USA con il nome di PuraStat® (<https://3dmatrix.com/products/purastat/>). Inoltre, sono stati completati diversi studi preliminari per il suo utilizzo in campo odontoiatrico e nella resezione endoscopica di mucose.

Nelle applicazioni *in vivo* bisogna tenere conto dei numerosi meccanismi biologici che possono modificare la struttura dei biomateriali e quindi comprometterne le applicazioni. Per esempio si può avere la degradazione del biomateriale in seguito all'azione di enzimi endogeni. La biodegradazione, sebbene auspicabile, non deve avvenire in tempi troppo brevi. Inoltre, sul biomateriale possono adsorbirsi proteine solubili o vi si può depositare nuova matrice extracellulare, tutti fattori che vanno studiati attentamente e considerati sin dalla progettazione del biomateriale stesso. Di fondamentale importanza per lo sviluppo di future applicazioni cliniche è la valutazione di risposte infiammatorie e/o immunitarie del sistema ospite in seguito all'interazione con il biomateriale.

A oggi, sono stati condotti diversi studi sull'utilizzo *in vivo* di peptidi autoassemblanti per la rigenerazione tissutale di tessuto cardiaco, osseo, cartilagine, ecc., con risultati molto promettenti. Di particolare rilevanza è il fatto che in generale tali biomateriali non inducono una forte reazione immunitaria, come dimostrato da alcuni studi recenti (8).

In conclusione, numerosi studi presenti in letteratura hanno dimostrato che diversi sistemi cellulari sono in grado di crescere, migrare e differenziarsi all'interno di *scaffold* a base di peptidi autoassemblanti. Tali materiali possono essere preparati in modo da includervi fattori di crescita, cellule staminali e molecole bioattive di interesse. In futuro, lo sviluppo di materiali funzionali in grado di indurre la rigenerazione di tessuti in maniera selettiva e la possibilità di sviluppare cure personalizzate potranno rivoluzionare diversi campi della medicina fornendo nuove strategie terapeutiche per la cura di numerose patologie.

Bibliografia

1. Toledano S, Williams RJ, Jayawarna V, Ulijn RV. Enzyme-triggered self-assembly of peptide hydrogels via reversed hydrolysis. *J Am Chem Soc* 2006;128(4):1070-1.
2. Nisbet DR, Williams RJ. Self-assembled peptides: characterisation and *in vivo* response. *Biointerphases* 2012;7:1-4.
3. Schneider JP, Pochan DJ, Ozbas B, Rajagopal K, Pakstis L, Kretsinger J. Responsive hydrogels from the intramolecular folding and self-assembly of a designed peptide. *J Am Chem Soc* 2002; 124(59):15030-7.
4. Pochan DJ, Schneider JP, Kretsinger J, Ozbas B, Rajagopal K, Haines L. Thermally reversible hydrogels via intramolecular folding and consequent self-assembly of a de novo designed peptide. *J Am Chem Soc* 2003;125(39):11802-3.
5. Gungormus M, Branco M, Fong H, Schneider JP, Tamerler C, Sarikaya M. Self assembled bi-functional peptide hydrogels with biomineralization-directing peptides. *Biomaterials* 2010; 31(28):7266-74.
6. Zhang S, Holmes T, Lockshin C, Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90(8):3334-8.
7. Genové E, Shen C, Zhang S, Semino CE. The effect of functionalized self-assembling peptide *scaffolds* on human aortic endothelial cell function. *Biomaterials* 2005;26(16):3341-51.
8. Guo J, Leung KK, Su H, Yuan Q, Wang L, Chu TH, Zhang W, Pu JK, Ng GK, Wong WM, Dai X, Wu W. Self-assembling peptide nanofiber *scaffold* promotes the reconstruction of acutely injured brain. *Nanomedicine* 2009;5(3):345-51.

DRUG DELIVERY E INCAPSULAMENTO CELLULARE: MATERIALI, DISPOSITIVI, MECCANISMI DI RILASCIO E INTERAZIONE CON LE CELLULE

Ilaria Cacciotti

Dipartimento di Ingegneria, Università degli Studi Niccolò Cusano, Roma

Drug delivery

Il *drug delivery* consiste nella somministrazione di farmaci, biomolecole e fattori di crescita (*growth factor*) tramite l'impianto o l'iniezione di Sistemi a Rilascio Controllato (SRC) (1).

Lo scopo finale del *drug delivery* è rappresentato dal superare i limiti della somministrazione tradizionale, quali:

- distribuzione del farmaco in tutto il corpo del paziente in maniera incontrollata attraverso il circolo sanguigno;
- limitata possibilità di rilascio diretto in ambiente fisiologico di farmaci a emivita bassa (necessità di trattamenti ripetuti per poter mantenere un adeguato livello terapeutico);
- degradazione di molti principi attivi durante l'attraversamento del tratto gastro-intestinale;
- inadeguato assorbimento del farmaco in quantità tali da risultare efficace;
- trattamenti terapeutici lunghi;
- concentrazione del farmaco con tipico andamento pulsato ("a dente di sega"), con indesiderate punte di massimo al di sopra della soglia tossica (sovradosaggio), e gole di minimo al sotto della concentrazione minima efficace, dovuta a reiterazione del trattamento (Figura 1a).

I sistemi a rilascio controllato devono, infatti, garantire:

- di agire come veicolo delle molecole verso il sito d'azione nella loro forma attiva, preservandole dalla deattivazione e denaturazione;
- l'incremento della solubilità di farmaci poco solubili;
- un rilascio uniforme con andamento prevedibile sia nello spazio che nel tempo;
- la possibilità di rilascio localizzato al sito bersaglio, con incremento dell'efficienza del farmaco;
- il mantenimento di una concentrazione ematica del principio attivo all'interno della "finestra terapeutica" per un tempo prolungato (Figura 1b).

In tale modo i sistemi a rilascio controllato consentono di ridurre la dose di farmaco da somministrare e la frequenza di somministrazione, prevenendo/limitando i relativi effetti collaterali.

Lo sviluppo e la messa a punto di sistemi alternativi per l'indirizzamento dei farmaci nell'organismo richiedono di tenere conto simultaneamente di diversi aspetti:

- materiale,
- meccanismo di rilascio,
- geometria e dimensioni,
- quantità di farmaco.

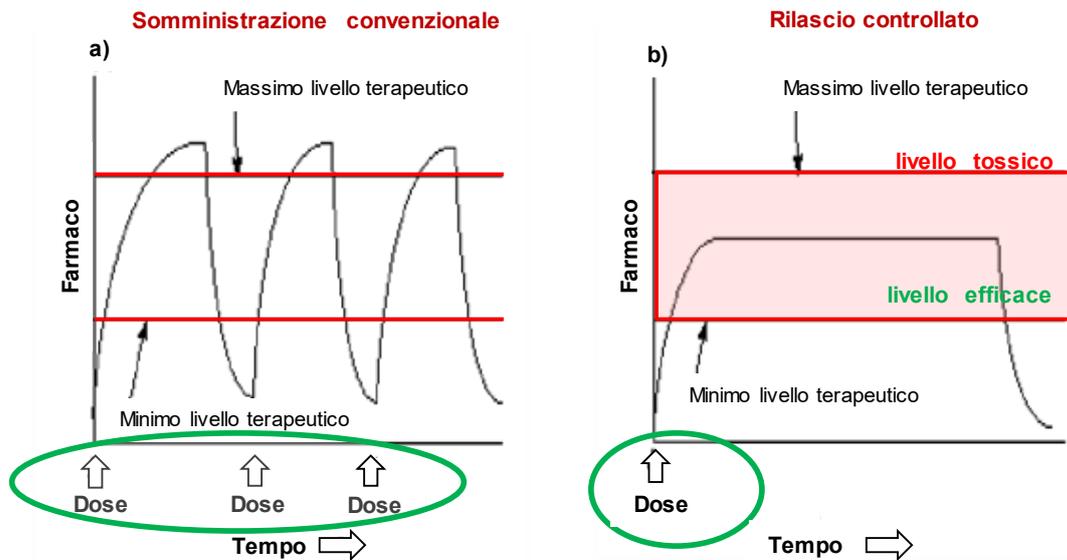


Figura 1. Andamento della concentrazione del farmaco nel caso di una somministrazione convenzionale (a) e di un sistema a rilascio controllato (b)

Un sistema ideale deve soddisfare i seguenti prerequisiti:

- essere biocompatibile,
- essere semplice da impiantare, somministrare e rimuovere,
- essere capace di contenere elevate quantità di farmaco,
- essere facilmente fabbricabile e sterilizzabile.

Si possono seguire due strategie distinte per il trasporto dei farmaci/*growth factors*, in maniera tale che possano essere resi disponibili alle cellule che entrano in contatto con la matrice:

1. immobilizzazione chimica all'interno di una matrice polimerica (approccio covalente): immobilizzazione covalente dei fattori di crescita (o molecole che ne mimano il funzionamento) alla matrice;
2. incapsulamento fisico all'interno di una membrana polimerica (approccio non covalente): adsorbimento fisico dovuto a legami a idrogeno o a interazioni idrofobiche con molecole eccipienti.

Entrambi questi approcci si basano sulla diffusione e sul rilascio programmato nel tessuto circostante, con conseguente elevato livello di controllo sulla distribuzione del segnale, dato che allo *scaffold* sono legate anche le cellule bersaglio.

L'approccio covalente (strategia 1) prevede la formazione di un legame chimico tra il farmaco/fattore di crescita e i polimeri tramite gruppi funzionali precedentemente incorporati durante il processo di copolimerizzazione o tramite trattamenti chimici o fisici. Tale tipo di strategia permette ai fattori legati alla matrice di degradarsi molto più lentamente, consentendo un rilascio prolungato. L'immobilizzazione chimica presenta, però, dei limiti: difficoltà nell'assegnazione del sito di accoppiamento sulla proteina e possibile perdita di bioattività delle proteine a causa dell'immobilizzazione o del danneggiamento dei gruppi funzionali.

L'approccio non covalente (strategia 2) o adsorbimento fisico sfrutta in genere le seguenti interazioni:

- interazioni secondarie dipolo-dipolo o legami idrogeno tra farmaco/fattore di crescita e matrici;
- interazioni indirette attraverso proteine intermedie o altre molecole biologiche: proteine come eparina, fibronectina, gelatina e piccoli oligopeptidi possono essere rivestite chimicamente o fisicamente per fornire siti specifici per immobilizzare i fattori di crescita o morfogeni.

I materiali comunemente utilizzati per questo approccio sono essenzialmente gel biopolimerici, quali fibronectina, laminina, collagene, elastina, acido ialuronico, o una varietà di idrogeli sintetici, per la loro proprietà di riprodurre la membrana extracellulare.

Le possibili cinetiche di rilascio sono riportate in Figura 2, dove è possibile identificare i seguenti profili, tra i quali, i primi due sono quelli più comuni:

- profilo I, rilascio convenzionale, ritardato, non costante;
- profilo II, rilascio di ordine zero: la concentrazione è mantenuta al livello ottimale per gli effetti terapeutici;
- profilo III, rilascio ritardato seguito da rilascio costante: utile per il rilascio di agenti attivi che devono svolgere la loro azione durante la notte;
- profilo IV, rilascio impulsivo ritardato: valido per un'azione notturna (es. per un ormone, la cui somministrazione deve essere effettuata una singola volta e non in modo graduale);
- profilo V, rilascio impulsivo periodico: per somministrazioni che vanno effettuate a distanze temporali costanti.

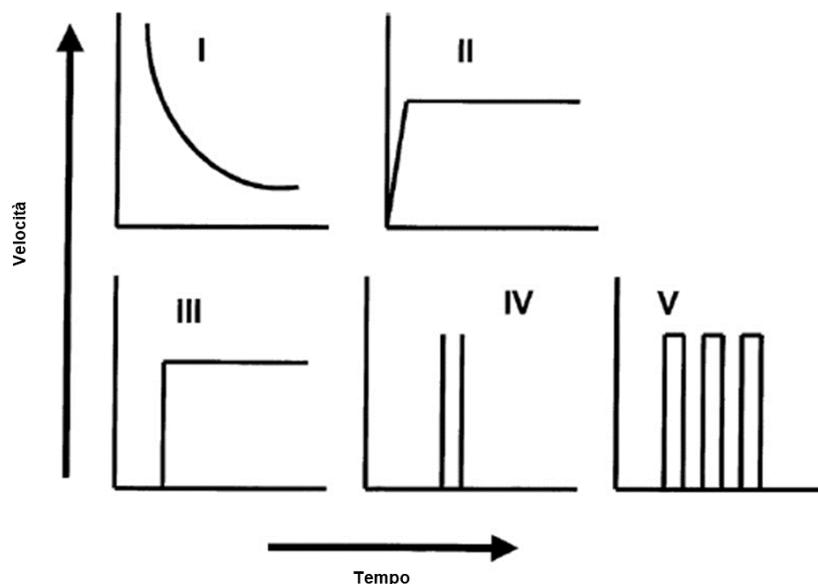


Figura 2. Possibili profili relativi alle diverse cinetiche di rilascio

Sistemi a rilascio controllato

Nel design di un sistema a rilascio controllato è possibile ottenere un *targeting* passivo o attivo (2).

Nel caso di un *targeting* passivo, la particella usata come veicolo non viene modificata in maniera tale da renderla selettiva per un bersaglio (*target*) specifico, ma usata tal quale.

Il *targeting* passivo è di solito effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (*Enhanced Permeability and Retention*, EPR) e sfrutta la tendenza naturale delle particelle ad accumularsi in alcune parti del corpo, in particolare nei tumori o nei tessuti infiammati che possiedono ipervascolarizzazione (endotelio attorno ai vasi sanguigni nel tumore è spesso molto discontinuo e permette così il passaggio di grandi particolati) e scarso drenaggio linfatico (mancanza di rimozione dei particolati) (3).

Nel caso di *targeting* attivo, le particelle veicolo vengono funzionalizzate sulla superficie con agenti specifici, detti di *target*, selettivi per specifici organi/cellule bersaglio.

Il *targeting* attivo garantisce notevoli vantaggi, quali:

- possibilità di far legare le nanoparticelle solo a siti specifici delle cellule malate;
- massimizzazione della concentrazione di farmaco sul sito d'interesse, così da ridurne la distribuzione in altre parti del corpo e, di conseguenza, contenere e evitare i relativi effetti collaterali.

Per ottenere un *target* attivo è possibile seguire diversi approcci:

- alterare la carica superficiale delle nanoparticelle;
- incorporare nanoparticelle magnetiche nella matrice polimerica;
- legare sulla superficie della nanoparticella un agente che interagisce con recettori specifici o che viene riconosciuto dai tumori stessi (es. peptidi, proteine, oligonucleotidi, anticorpi monoclonali).

Tra questi approcci, il terzo risulta il più diffuso e utilizzato, essendo possibile legare molecole specifiche sulla superficie mediante:

- legame covalente sfruttando gruppi funzionali superficiali (per esempio, reazione di *coupling* tra un acido carbossilico e un'ammina, gruppi in genere abbondanti su proteine e peptidi) (modalità più comune);
- interazione elettrostatica.

I "sistemi" di trasporto possono essere classificati secondo diversi criteri (4). A seconda del meccanismo che regola il rilascio del farmaco, sono classificati in sistemi:

- 1) a diffusione controllata mediante:
 - a) serbatoio (sistemi a membrana)
 - b) matrice (sistemi monolitici)
- 2) controllati chimicamente, nello specifico:
 - a) bioerodibili e biodegradabili
 - b) a catena pendente
- 3) attivati da solvente, vale a dire:
 - a) sistemi controllati osmoticamente
 - b) sistemi controllati mediante rigonfiamento
- 4) sistemi a rilascio modulato.

Il meccanismo di rilascio maggiormente utilizzato si basa sulla diffusione, come schematizzato.

I sistemi a diffusione controllata sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso il polimero, che subirà biodegradazione una volta assolto il proprio compito e si possono suddividere in due sottocategorie: sistemi a serbatoio e sistemi monolitici (mediante matrice).

I sistemi a serbatoio sono sistemi cavi in cui un nucleo interno di farmaco è circondato da una membrana polimerica esterna, comunemente a base di idrogel, che, rigonfiandosi, apre le porosità e rilascia il farmaco. Il trasporto avviene tipicamente secondo meccanismi di diffusione, con

cinetica tipicamente di ordine zero finché il farmaco è in alta concentrazione all'interno della membrana.

I sistemi monolitici (mediante matrice) sono sistemi in cui il farmaco è dissolto (o disperso) uniformemente in una matrice polimerica e viene rilasciato per rigonfiamento dell'intero sistema grazie all'apertura dei canali delle porosità. Tali sistemi presentano una cinetica di rilascio di primo ordine, in cui si ha un alto tasso di diffusione all'inizio, che poi decresce nel tempo.

Nel caso dei sistemi controllati chimicamente il rilascio ha luogo in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada a causa della presenza di legami labili idroliticamente o enzimaticamente, che coinvolgono o la superficie o il *bulk*.

Tale meccanismo di rilascio viene definito erosione: per i materiali bioerodibili la cinetica di rilascio dipende dall'erosione (degradazione chimica o biochimica) che avviene in massa (*bulk*) per i polimeri idrofili o in superficie per quelli idrofobi.

Tali sistemi possono essere suddivisi in due diverse tipologie:

a) bioerodibili e biodegradabili:

- si evita la necessità di una rimozione chirurgica ma i prodotti di degradazione non dovranno provocare reazioni tossiche o cancerogene, condizione abbastanza difficile da raggiungere.

b) a catena pendente:

- la molecola del farmaco è legata chimicamente al polimero e viene rilasciata da una scissione idrolitica o enzimatica;
- la velocità di rilascio è legata alla velocità con cui i legami vengono rotti dall'azione dell'acqua o delle proteine, consentendo al farmaco di agire su uno specifico tipo di cellule o tessuti.

I sistemi attivati dal solvente presentano un comportamento tipico di idrogeli (macromolecole a struttura reticolata create in modo da formare una maglia aggrovigliata che svolge il ruolo di matrice per l'intrappolamento di farmaci).

Quando questi idrogeli vengono a contatto con un solvente compatibile termodinamicamente, le catene polimeriche si rilassano (specialmente quando la temperatura di transizione vetrosa è inferiore a quella dell'ambiente circostante), permettendo un flusso di acqua verso l'interno e la diffusione verso l'esterno del farmaco.

Nei sistemi a rilascio modulato il rilascio è controllato da stimoli esterni quali temperatura, pH, campi elettrici, campi magnetici, radiazione elettromagnetica, raggi UV, ecc.

Si possono identificare diverse tipologie di sistemi per il rilascio controllato (5).

Le ciclodestrine consistono in oligosaccaridi ciclici naturali formati da 6, 7 o 8 monomeri di glucosio (zucchero) e si organizzano in maniera tale da ottenere strutture anfifiliche e da incapsulare all'interno il farmaco.

I dendrimeri consistono in polimeri sintetici altamente ramificati con un'architettura a strati costituita da tre parti: un nucleo (*core*) polifunzionale, delle unità ramificanti e i gruppi funzionali superficiali, che ne determinano le caratteristiche.

Tali sistemi sono prodotti attraverso condensazioni ripetitive della stessa unità ramificata, al fine di originare strutture altamente regolari e complesse.

Per la loro sintesi, vengono fatti reagire una diammina (comunemente etilendiammina) con acrilato di metile. La loro formazione parte da un *core* centrale che fa da centro di nucleazione e le ramificazioni che partono da un unico ramo ancestrale formano una struttura definita dendrone. Ogni ramificazione successiva è detta generazione.

Le vescicole o miscele sono composte da lipidi o molecole anfifiliche, che si auto-assemblano formando delle vescicole con un *core* idrofobico, ispirandosi alla struttura delle membrane

cellulare o plasmatica, consistente in un doppio strato fosfolipidico. Per anfifilico si intende, infatti, una sostanza con una porzione polare idrofila (lipofoba) e apolare idrofoba (lipofila), che quindi sia in grado di auto-organizzarsi in soluzione acquosa diluita o di interagire all'interfaccia fra le fasi acquosa e non acquosa di un sistema bifasico. Sono comunemente utilizzate per trasportare numerose tipologie di farmaci lipofili.

Un copolimero, come noto, si ottiene dalla polimerizzazione simultanea di due o più monomeri con la formazione di legami covalenti tra le unità monomeriche diverse (o sequenze di unità diverse) a formare l'unità ripetitiva o costitutiva caratteristica.

I copolimeri a blocchi sono caratterizzati da una struttura in cui una sequenza di un tipo di monomero è alternata con una sequenza dell'altro monomero come, per esempio:

AAAAABBBBBBBBAAAAABBBBBBBBAAAAA

indicando con A e B due monomeri diversi.

I liposomi consistono in vescicole fosfolipidiche (50–100 nm) che si generano attraverso il *self assembly* di lipidi anfifilici che formano un *bilayer* basato su interazioni idrofobiche che avvengono in parallelo lungo una superficie continua, con le teste idrofiliche disposte sul versante acquoso. In genere, sono utilizzati come *carriers* in cui le molecole idrofiliche sono incapsulate nella fase acquosa interna, mentre le molecole idrofobiche trasportate nel *bilayer* lipidico.

I polimersomi presentano struttura e applicazioni simili ai liposomi, consistendo in liposomi composti da polimeri.

I sistemi a matrice consistono in sistemi in cui il farmaco è distribuito uniformemente nel polimero e si distinguono in:

- a) matrici (propriamente dette)
- b) sfere (nano e microsfele)

Le matrici (propriamente dette) sono sistemi costituiti dalla dispersione uniforme del farmaco nel polimero e si possono distinguere, in funzione del polimero impiegato, in matrici idrofobe e matrici idrofile, e, in funzione della tecnologia impiegata, in matrici omogenee (o non porose) e matrici eterogenee (o porose).

Le matrici presentano diversi vantaggi, essendo:

- facili da preparare
- versatili
- non pericolose
- poco costose
- possibilità di modulare e controllare il rilascio
- adatte a tutti i farmaci purché solidi.

Tale tipologia di SRC, però, non consente di incorporare farmaci liquidi o gassosi.

Per tutti questi motivi, le matrici propriamente dette sono impiegate per applicazioni:

- via orale (matrici idrofobe, matrici idrofile, matrici rivestite);
- via transdermica;
- via transmucosale;
- via sottocutanea.

Le matrici idrofile sono, in genere, sistemi porosi ottenuti per compressione di una polvere o di un granulato costituiti dal farmaco, dal polimero (spesso derivati idrofili della cellulosa) e da eventuali altri eccipienti dispersi uniformemente.

Il rilascio del farmaco dalle matrici idrofile può avvenire secondo diverse modalità:

- diffusione del farmaco;
- degradazione del polimero;

- rigonfiamento del polimero.

Il rilascio del farmaco e la velocità di rilascio da matrici idrofile possono essere influenzati da:

- rapporto farmaco/polimero,
- porosità del sistema,
- caratteristiche del farmaco,
- caratteristiche del polimero,
- dimensioni delle particelle del polimero e del farmaco,
- viscosità del gel che si forma in seguito a idratazione del polimero,
- presenza di eccipienti.

In particolare, si osservano comportamenti diversi a seconda della tipologia di farmaco, del suo grado di solubilità e dimensioni, come riportato in dettaglio di seguito:

- farmaci solubili e/o di piccole dimensioni vengono più facilmente rilasciati per diffusione attraverso il polimero gelificato;
- farmaci di grandi dimensioni e/o meno solubili possono essere rilasciati in seguito all'erosione o al rigonfiamento del polimero in funzione della velocità dei due processi;
- polimeri ad alto peso molecolare o con elevato grado di reticolazione gelificano e si erodono molto lentamente nel tempo e spesso in funzione anche delle caratteristiche del farmaco permettono un controllo del rigonfiamento o dell'erosione sul rilascio.

La velocità di rilascio da matrici difficilmente è costante:

1. se il rilascio è controllato dalla diffusione diminuisce nel tempo;
2. se il rilascio è controllato dall'erosione o dal rigonfiamento del polimero è costante solo se la geometria è piana;
3. se il rilascio è controllato da due meccanismi non è costante.

Per regolarizzare la velocità di rilascio da sistemi a matrice sono stati proposti alcuni approcci: la modificazione della geometria del sistema o l'impiego di additivi.

Per quanto riguarda invece le matrici idrofobe, queste consistono in sistemi omogenei ottenuti o per evaporazione del solvente da una soluzione contenente farmaco e polimero oppure per fusione del polimero e incorporazione allo stato fuso del farmaco seguita da raffreddamento.

Il rilascio del farmaco dalle matrici idrofobe avviene in genere per diffusione del farmaco attraverso il polimero; se il polimero è biodegradabile il rilascio da una matrice idrofoba potrebbe essere controllato o dalla diffusione del farmaco o dalla degradazione polimerica o da entrambi i meccanismi. In genere: i farmaci solubili e/o di piccole dimensioni vengono più facilmente rilasciati per diffusione attraverso il polimero, mentre farmaci di grandi dimensioni e/o poco solubili possono essere rilasciati solo in seguito all'erosione superficiale della matrice.

Il meccanismo di rilascio del farmaco potrebbe essere condizionato anche dalle caratteristiche strutturali del polimero, quali: il peso molecolare, il grado di reticolazione e la velocità di degradazione.

Le sfere consistono in particelle sferiche con dimensioni macro (cioè maggiore di 1mm), micro (100- 0,1 μm), nano (100 – 1 nm), nelle quali il farmaco è uniformemente distribuito nella fase polimerica (sistema a matrice).

Il rilascio del farmaco può avvenire attraverso meccanismi diversi:

- diffusione del farmaco attraverso il polimero;
- desorbimento del farmaco;
- erosione della matrice (polimeri biodegradabili);
- rigonfiamento del polimero (polimeri idrofili).

I fattori che possono influenzare la velocità di rilascio del farmaco dalle microsfele si dividono in quelli inerenti al farmaco (dimensioni molecolari, idrofilia, quantità, distribuzione); in fattori

inerenti alle microsfele (tipo e quantità di polimero (PM, reticolazione), dimensioni, forma) e quelli relativi al mezzo (pH, presenza di enzimi).

I materiali da impiegare per la produzione di tali sistemi devono soddisfare i seguenti prerequisiti:

- presentare un comportamento anfifilico;
- essere non tossico;
- essere biocompatibile;
- essere biodegradabile;
- subire una degradazione controllata;
- rispondere a specifici stimoli (pH, T, solventi, luce, ecc.).

I materiali comunemente impiegati sono classificabili in:

- non-degradabili (per esempio, poliuretani (PU), polimetilmetacrilato (PMMA), polietilene (PE).
- biodegradabili (per esempio copolimeri di acido polilattico e poliglicolico, poliesteri, polianidridi, idrogeli).

I polisaccaridi presentano proprietà che li rendono utilizzabili in ambito biomedicale:

- biocompatibilità;
- non citotossicità;
- alta idrofilia;
- alto contenuto d'acqua;
- versatilità;
- presenza di un elevato numero di siti reattivi sulla catena polimerica;
- elevati gradi di caricamento di farmaco e di tipologie di coniugazione.

Proprio per tali caratteristiche, sono impiegati in ambito farmaceutico, cosmetico, alimentare, agricolo e biomedicale, per le seguenti applicazioni:

- biomateriali per ingegneria tissutale;
- come sistemi di *drug delivery*;
- come sistemi di *gene delivery*;
- biomateriali per la produzione di lenti a contatto;
- come rivestimenti per tessuti artificiali e dispositivi medici.

Gli idrogeli presentano diversi vantaggi, come riportato di seguito:

- struttura tridimensionale;
- proprietà idrofiliche;
- possono presentarsi in varie forme, come lastre, microparticelle, nanoparticelle, rivestimenti e pellicole;
- la loro struttura altamente porosa può essere facilmente regolata controllando la densità dei legami incrociati (*crosslinking*) nella matrice;
- biocompatibilità (elevato contenuto d'acqua e somiglianza fisicochimica, compositiva e meccanica con la matrice extracellulare nativa);
- biodegradabilità (per via enzimatica, idrolitica o ambientale (per esempio può essere dovuta al pH, alla temperatura, al campo elettrico));
- deformabilità (capacità di conformarsi alla superficie di applicazione);
- in alcuni casi proprietà “bioadesive”, vantaggiose nel momento in cui si richiede una loro immobilizzazione al sito di applicazione;
- elevata capacità di *loading*;
- elevata capacità di protezione delle biomolecole trasportate dalla degradazione metabolica cellulare;

- incremento della biodisponibilità dei farmaci a basso peso molecolare, nel caso della somministrazione per via orale;
- possibilità di intrappolare un *core* metallico o minerale per il bio *imaging*;
- rilascio dei farmaci inglobati secondo una cinetica dipendente dal coefficiente di diffusione della molecola all'interno della matrice stessa;
- capacità di mantenere un'elevata concentrazione locale di farmaco nei tessuti circostanti per un periodo prolungato.

Allo stesso tempo è possibile annoverare diverse criticità, quali:

- bassa resistenza alla trazione (problema non rilevante in alcune applicazioni di *drug delivery* come nei casi di applicazione sottocutanea);
- problemi di quantità e omogeneità di caricamento del farmaco nell'idrogel, in particolare nel caso di farmaci idrofobi;
- rilascio del farmaco troppo veloce (di qualche ora o qualche giorno), a causa dell'elevato contenuto d'acqua e grandi dimensioni dei pori;
- necessità di impianto chirurgico per alcuni idrogel non sufficientemente deformabili per essere iniettati.

Tali sistemi possono essere progettati in modo da renderli “smart”, cioè capaci di rispondere a cambiamenti dell'ambiente esterno per avere un controllo temporale e spaziale del rilascio del carico trasportato:

- sensibili alla temperatura
- complessanti
- sensibili a reazioni chimiche o enzimatiche
- sensibili a campi magnetici.

Attualmente sono in fase di studio sistemi multifunzionali, caratterizzati dalla presenza all'interno del materiale di cellule, farmaci, fattori di crescita e biomolecole con specifiche funzioni, come, per esempio, del plasma ricco di piastrine (PRP) (frazione di plasma sanguigno che contiene multipli fattori di crescita (utilizzabile da solo o con altri biomateriali)).

Tali materiali agiscono come *carrier* di biomolecole con attività specifiche (es. antiossidanti e antimicrobiche) di farmaci e fattori di crescita per ottenere una *delivery* controllata.

Si ricorre a diversi approcci: incapsulamento di uno o più elementi (*cues*) bioattivi simultaneamente all'interno dello *scaffold* (in forma di sfere, capsule, particelle, fibre, *coating*, ecc.) o fisi/chemi-sorbendolo sulla sua superficie (6-9).

Notevoli sforzi sono attualmente indirizzati alla modifica della superficie di *scaffold* al fine di indirizzare il differenziamento cellulare e di favorire la rigenerazione del tessuto, mediante la creazione di specifiche nanotopografie, ricorrendo a tecniche di *micropatterning*, quali fotolitografia per fabbricare *pattern* chimici o topografici, *microContact Printing* (μ CP) per fabbricare *pattern* chimici, *transfer lithography* per generare un *micropattern* in metallo (es. oro) su materiali polimeri (es. idrogeli in PEG, *PolyEthylene Glycol*).

Bibliografia

1. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation* 2012;2(1):2.
2. Dand N, Patel P, Ayre A, Kadam V. Polymeric micelles as a drug carrier for tumor targeting. *Chronicles of Young Scientists* 2013;4(2):94.

3. Ashfaq UA, Riaz M, Yasmeen E, Yousaf MZ. Recent advances in nanoparticle-based targeted drug-delivery systems against cancer and role of tumor microenvironment. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2017;34(4):317-53.
4. Siegel RA, Rathbone MJ. Overview of controlled release mechanisms. In Siepmann *et al.* (Eds). *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. Boston (MA): Springer; 2012. p. 19-43.
5. Muthu MS, Leong DT, Mei L, Feng SS. Nanotheranostics- application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. *Theranostics* 2014;4(6):660-77.
6. Cacciotti I, Ceci C, Bianco A, Pistrutto G. Neuro-differentiated Ntera2 cancer stem cells encapsulated in alginate beads: first evidence of biological functionality. *Materials Science and Engineering C* 2017;81:32-38.
7. Cacciotti I, Ciocci M, Di Giovanni E, Nanni F, Melino S. H₂S-releasing fibrous membranes: potential patches for stimulating the human stem cells proliferation and viability under oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;9(8):2368.
8. Cacciotti I, Chronopoulou L, Palocci C, Amalfitano A, Cantiani M, Cordaro M, Lajolo C, Callà C, Boninsegna A, Lucchetti D, Gallenzi, P, Sgamato A, Nocca G, Arcovito A. Controlled release of 18-β-glycyrrhetic acid by nanodelivery systems increases cytotoxicity on oral carcinoma cell line. *Nanotechnology* 2018;29(28):285101.
9. Ciocci M, Cacciotti I, Seliktar D, Melino S. Injectable silk fibroin-hydrogels functionalized with microspheres as adult stem cells-carrier systems. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018;108:960-971.

BIOMATERIALI PER SISTEMI PER IL *DRUG DELIVERY* NEL TRATTAMENTO TOPICO DI MALATTIE LOCALI DEL CAVO ORALE

Giuseppina Nocca

Istituto Biochimica Clinica, Università Cattolica Sacro Cuore, Roma

Le malattie della mucosa orale sono tra le malattie più comuni che colpiscono l'uomo e possono essere trattate efficacemente con approcci terapeutici topici, grazie alla facile accessibilità della cavità orale (1, 2).

Tuttavia, solo alcune formulazioni topiche sono considerate specifiche per il trattamento delle malattie della mucosa orale, e la maggior parte di esse è mutuata dalla dermatologia e gravata da tutti i limiti intrinseci associati a queste formulazioni (consistenza viscida e cattivo sapore) (3-6).

La cavità orale ha caratteristiche strutturali, ambientali e funzionali che differiscono dalla pelle. Infatti, saliva, deglutizione, masticazione e fonazione agiscono per lavare via la maggior parte del farmaco dal sito di applicazione, con conseguente breve tempo di ritenzione del principio attivo e, di conseguenza, bassa efficacia terapeutica.

Per questi motivi, forme di somministrazione locale di farmaci dovrebbero essere in grado di superare una rapida perdita di farmaco dal sito di assorbimento per dilavazione salivare; la scarsa compliance del paziente e la diversa permeabilità delle diverse superfici del cavo orale.

La mucosa orale si compone di due strati anatomici e funzionali: un epitelio squamoso avascularizzato, denso e stratificato, e uno strato sottostante, leggermente vascularizzato di origine mesodermica (il corion o la lamina propria) (1, 2). L'epitelio della mucosa orale ha uno spessore di circa 40-50 strati cellulari, con uno spessore che dipende dal sito. L'epitelio stratificato squamoso orale è suddiviso in epitelio non cheratinizzato e cheratinizzato. I processi di differenziazione che avvengono negli epitelii cheratinizzati e non cheratinizzati differiscono in modo significativo. La mucosa orale è, inoltre, ricoperta da muco, costituito da glicoproteine (mucine) cariche negativamente. Le mucine contribuiscono alla visco-elasticità della saliva, mantengono il pH 5,8-7,4 e proteggono le cellule epiteliali (1, 2).

La mucosa orale può essere distinta in:

- mucosa di rivestimento, riveste labbra, guance, palato molle, superficie inferiore della lingua e pavimento della bocca (60%).
- mucosa masticatoria, riveste le gengive e il palato duro (25%).
- mucosa specializzata riveste il dorso della lingua (15%).

Conoscere la permeabilità delle diverse zone della mucosa è cruciale per selezionare la formulazione più appropriata per l'assorbimento del farmaco.

Lo strato connettivale non agisce come barriera (1, 2).

Gli strati "barriera" sono:

- lamina basale;
- spazio intercellulare nello strato epiteliale per la presenza dei granuli di derivazione cheratinocitaria.

L'assorbimento del principio attivo può avvenire attraverso due vie: transcellulare e paracellulare. Quindi, per decidere se è possibile utilizzare *oral drug delivery* per trattare una

patologia locale o sistemica dovrò valutare la permeabilità della mucosa nella zona d'interesse e l'assorbimento del farmaco (1, 2).

Il *drug delivery* locale, via mucosa orale, può essere diviso in due categorie:

- via mucosa cheratinizzata
- via mucosa non cheratinizzata.

La scelta di un approccio piuttosto che un altro dipende principalmente dalle differenze regionali in termini di caratteristiche anatomiche e di permeabilità, che esiste tra questi siti di mucosa orale.

La mucosa cheratinizzata, come la gengiva e la mucosa palatale dura, non sono ancora considerate un sito valido per la somministrazione sistemica di farmaci, e dovrebbero essere considerati come siti utili per la somministrazione locale (diretta) di farmaci per il trattamento di malattie orali localizzate a livello della gengiva o del palato.

Il rilascio di farmaci attraverso la mucosa non cheratinizzata può essere suddiviso in due approcci: somministrazione di farmaci sublinguale (che è il rilascio sistemico di farmaci attraverso la mucosa che riveste il pavimento della bocca) e il rilascio del farmaco attraverso la mucosa buccale (trattamento locale).

Il *drug delivery* locale ha dei vantaggi, come quello di ridurre la distribuzione sistemica del farmaco ma anche dei limiti: ovvero il limitato tempo di esposizione, il cattivo sapore e la non omogenea distribuzione.

I sistemi mucoadesivi sono sistemi polimerici in grado di veicolare farmaci, aderendo alla mucosa orale. Questi sistemi superano tutti i problemi di *delivery* nel cavo orale [6-10]. Essi, infatti, aumentano il tempo di permanenza del farmaco nel sito, ne aumentano, quindi, l'assorbimento e migliorano la *compliance*.

La mucoadesione è un fenomeno complesso che avviene in varie fasi:

- diffusione, umidificazione e dissoluzione del polimero mucoadesivo all'interfaccia.
- intreccio meccanico o fisico tra il polimero e lo strato di muco superficiale del tessuto, risultante in uno strato di penetrazione.

Il passo successivo è il risultato di interazioni chimiche, come i legami covalenti e ionici, il legame idrogeno e le interazioni di Van der Waals. I legami idrogeno e le interazioni idrofobiche sono i più desiderabili nello sviluppo di sistemi mucoadesivi, in quanto i legami covalenti e legami ionici potrebbero causare danni irreversibili alla superficie della mucosa (8, 9).

La mucoadesione è influenzata dal pH. Per migliorare le proprietà mucoadesive intrinseche di un polimero, nuove forme di dosaggio buccale possono essere composte da diversi polimeri mucoadesivi e nuovi copolimeri, piuttosto che utilizzare singoli sistemi polimerici.

Tra questi esistono i seguenti sistemi:

- tipo monolitico o matrice: in cui il farmaco è uniformemente disperso o disciolto nella matrice polimerica e il rilascio del farmaco è influenzato dalla diffusione attraverso la rete polimerica.
- tipo a membrana controllata: un farmaco è intrappolato tra un supporto impermeabile e una membrana polimerica che controlla il tasso di rilascio.

Le caratteristiche desiderabili del sistema adesivo orale includono:

- a) elevata capacità di carico di farmaco.
- b) non irritante per i tessuti.
- c) buona mucoadesione.
- d) comfort del paziente.
- e) erogazione di farmaci sostenuta.

Sono disponibili diversi sistemi mucoadesivi per lo scopo della somministrazione locale di farmaci:

– *Compresse adesive*

Le compresse vestibolari sono piccole, piatte e ovali diametro da 5 a 8 mm e spessore di circa 2 mm. In presenza di saliva, aderiscono alla superficie della mucosa fino alla dissoluzione e/o rilascio del farmaco. Dopo essere stato in bocca per un breve periodo, il paziente di solito non è più consapevole della sua presenza. Possono essere applicate compresse vestibolari adesive in diversi siti nella cavità orale, incluso il palato e la mucosa delle guance. Per prevenire la perdita di farmaco dalla superficie superiore della compressa, sono state sviluppate compresse specializzate con 2 strati. Contengono uno strato bioadesivo caricato di farmaco e uno strato di supporto impermeabile per promuovere l'assorbimento unidirezionale del farmaco e per ridurre al minimo perdita di farmaco nella cavità orale. Dispositivi per il rilascio di farmaci mucoadesivi contenenti sia un rilascio rapido che uno strato a rilascio controllato. Gli svantaggi sono: Scarsa flessibilità nel tempo e, quindi, fastidio in caso di terapie lunghe (9).

– *Cerotti e film o pellicole adesive*

Il primo passo nello sviluppo di questa forma di dosaggio adesiva è la selezione e caratterizzazione di un polimero (o combinazione di polimeri) con proprietà bioadesive appropriate e il controllo del rilascio del farmaco. I cerotti e i film bioadesivi sono laminati, costituito da uno strato polimerico caricato di farmaci, uno strato di supporto impermeabile, per promuovere l'unidirezionale rilascio di farmaci e, in generale, componenti mucoadesivi con o senza ritardanti di rilascio e additivi, come potenziatori della penetrazione o inibitori enzimatici. Cerotti e film hanno un'elevata flessibilità, facilitando così a tempo di residenza/conservazione prolungato, oltre a un alto livello di *compliance* e *comfort* del paziente. Inoltre, forniscono un dosaggio più accurato della somministrazione di farmaci. Gli svantaggi sono: area di *delivery* limitata, perdita di carico e rimozione (12).

– *Gel o unguento (es. sistemi adesivi semisolidi)*

Forme di dosaggio semisolidi, come gel e unguenti, hanno il vantaggio di una facile dispersione in tutta la mucosa orale. Formano un intimo contatto con la mucosa e rilascio rapido di farmaco al sito di assorbimento. Tuttavia, nonostante l'uso di polimeri bioadesivi, il tempo di permanenza dei gel è breve perché i fluidi corporei, come la saliva, li detergono rapidamente. Per queste ragioni, sono di uso limitato per farmaci con una stretta finestra terapeutica. Applicazione principale di gel mucoadesivi è nel trattamento delle condizioni orali come parodontite, stomatite aftosa ricorrente, ulcere traumatiche, mucosite orale, immunologicamente cronica, lesioni orali mediate e in una certa misura salivari ipofunzione. Vantaggi: Inizio rapido dell'azione e facilità d'uso. Svantaggi: dosaggio impreciso del farmaco e minor tempo di ritenzione del farmaco (7).

– *Spray mucoadesivi e risciacqui orali*

Sono liquidi adesivi che formano un rivestimento sottile sull'intera mucosa orale quando applicato. Questo tipo di formulazione aumenta la superficie totale attraverso la quale le molecole del farmaco possono essere assorbite. Terapia: *lichen planus* orale, stomatite aftosa ricorrente, mucosite orale, iposalivazione e disturbi potenzialmente maligni, come leucoplachia ed eritroplakia. Vantaggi: buona mucoadesione e viscoelasticità, maggiore *compliance* del paziente. Svantaggi: il dosaggio del farmaco potrebbe non essere accurato, amministrazione involontaria attraverso il tratto gastrointestinale dovuto alla deglutizione (11, 12).

I polimeri utilizzati per la mucoadesione sono i PAA (polimeri dell'acido acrilico). Questi polimeri sono *cross linked* con eteri polialchenici o con glycol divinilico. Sono prodotti come particelle di 0,2– 0,6 micron di diametro. Ogni particella è interconnessa a formare una rete dal cross linkante. I polimeri di carbopol insieme ai polimeri di pemulen e di noveon sono tutti reticolati. Si gonfiano in acqua fino a 1000 volte il loro volume originale per formare un gel se esposti a un pH da 4,0 a 6,0 (12). Vantaggi:

- buona scorrevolezza della formulazione in pastiglia;
- profili lunghi di rilascio di farmaci;
- sono sicuri ed efficaci per la somministrazione orale;
- maggiore biodisponibilità;
- sono approvati da molte farmacopecie del mondo.

Il chitosano è un polisaccaride cationico, prodotto dalla deacetilazione della chitina. Biocompatibile, biodegradabile e non tossico. Forma legami ionici con la mucosa. Flessibile. I suoi metaboliti sono eliminati dal fegato (8).

Nuovi polimeri di seconda generazione hanno i seguenti vantaggi:

- sono più citospecifici;
- sono meno colpiti dal ricambio di muco;
- *delivery* sito specifica.

Le lectine sono proteine presenti in natura coinvolte nel riconoscimento biologico. Le lectine sono una classe strutturalmente complessa di proteine e glicoproteine che si legano reversibilmente a specifici residui di carboidrati. Dopo il legame con la cellula, le lectine possono rimanere sulla superficie della cellula o entrare all'interno per endocitosi. L'unico svantaggio è che sono immunogeniche (12).

I polimeri tiolati sono tiomeri derivati da PAA o chitosano la presenza del gruppo tiolico aumenta il tempo di permanenza promuovendo legami covalenti con i residui cisteina nel muco. I legami disolfuro possono anche alterare il meccanismo di rilascio del farmaco dal sistema a causa di maggiore rigidità e *crosslinking* (12).

Conclusioni

Attualmente, molti farmaci biologicamente attivi per il trattamento di condizioni orali sono somministrati sistemicamente con possibili effetti collaterali gravi.

Lo sviluppo di sistemi efficaci per il *drug delivery* potrebbe essere molto interessante nel fornire una terapia più mirata, riducendo così le dosi di farmaco richieste e il rischio di effetti collaterali sistemici. Tuttavia, la relativa impermeabilità della cavità orale, altre variabili relative all'ambiente orale. Inoltre l'accettabilità, da parte del paziente, deve essere considerata.

Bibliografia

1. Magliocca KR, Fitzpatrick SG. Autoimmune Disease Manifestations in the Oral Cavity. *Surgical Pathology Clinics* 2017;10(1):57-88.
2. Lyer NG, *et al.* Randomized trial comparing surgery and adjuvant radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy in patients with advanced, nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 10-year update and subset analysis. *Cancer* 2015;121(10):1599-1607.
3. Sankar V, *et al.* Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. *Oral Diseases* 2011;17(S1):73-84.

4. Chau L, *et al.* Topical agents for oral cancer chemoprevention: A systematic review of the literature. *Oral Oncology* 2017;67:153-9.
5. Shipley CA, Spivakovsky S. Tacrolimus or clobetasol for treatment of oral lichen planus. *Evidence-Based Dental Practice* 2016;17(1):16.
6. Paderni C, *et al.* Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology* 2012;114(3):e25-e34.
7. Nazar H, *et al.* Hydrogels in mucosal delivery. *Therapeutic Delivery* 2012;3(4):535-55.
8. Chronopoulou L, *et al.* Chitosan based nanoparticles functionalized with peptidomimetic derivatives for oral drug delivery. *Nature Biotechnology* 2016;33(1):3-31.
9. Tiyaboonchai W, *et al.* Mucoadhesive polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles containing Punica granatum peel extract as a novel sustained-release antimicrobial. *Pharmaceutical develop and tech* 2015;20(4):426-32.
10. Chou LYT, *et al.* Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chemical Society Reviews* 2011;40(1):233-45.
11. Piao L, *et al.* Lipid-based nanoparticle delivery of Pre-miR-107 inhibits the tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Therapy* 2012;20(6):1261-9.
12. Nguyen S, Hiorth M. Advanced drug delivery systems for local treatment of the oral cavity. *Therapeutic Delivery* 2015;6(5):595-608.

CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLA CELLULA STAMINALE: STAMINALITÀ, METABOLISMO E INTERAZIONE CON I BIOMATERIALI

Giuseppina Nocca

Istituto Biochimica Clinica, Università Cattolica Sacro Cuore, Roma

La perdita o l'insufficienza funzionale di un organo o di un tessuto rappresentano uno degli aspetti più invalidanti, frequenti e costosi nell'ambito della sanità; il problema non è solamente limitato alla mancanza di organi in toto, ma coinvolge anche deficit tissutali localizzati, difficilmente risolvibili con l'ausilio dei soli e usuali trattamenti chirurgici o farmacologici (1). L'uomo da sempre cerca di risolvere – al meglio delle proprie capacità e possibilità – queste compromissioni, come documentato dai tanti reperti rinvenuti (sia di epoca egizia che etrusca) di individui sepolti con le loro “protesi”: conchiglie al posto dei denti, canini legati a filo d'oro tra due incisivi (antesignano dei moderni “ponti”), mummia egizia con alluce in legno, solo per citarne alcuni.

Con il passare dei secoli, con l'aumentare delle conoscenze scientifiche e delle scoperte tecnologiche, l'uomo ha cominciato a cercare di sostituire anche porzioni di tessuto osseo sia con trapianti omologhi che eterologhi, con risultati non sempre positivi. Colpisce il fatto che i primi innesti di tessuto osseo siano stati effettuati nel XVII secolo prima che fosse descritta per la prima volta la struttura ossea e che si cominciasse a parlare di callo osseo, impianto e riassorbimento.

Oggi la tecnica migliore a disposizione per ripristinare la funzionalità di organi persi o gravemente lesionati è il trapianto, tale metodica, tuttavia, risente della strutturale insufficienza di donatori e comporta, per il ricevente, la necessità di utilizzare, per tutta la vita, farmaci immunosoppressori con i ben noti effetti collaterali. In questo panorama, a cavallo tra gli anni '80 e '90 del secolo scorso, si inseriscono la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale, potenzialmente in grado di risolvere le problematiche legate al trapianto.

La medicina e la chirurgia rigenerativa sono un settore interdisciplinare di ricerche e applicazioni cliniche focalizzate prevalentemente sulla prospettiva di riparare, sostituire e/o rigenerare cellule, tessuti e/o organi al fine di ripristinare alcune funzioni anatomiche, fisiologiche e biochimiche deteriorate per cause differenti, come difetti congeniti, malattie, traumi e invecchiamento. La caratteristica più importante della medicina rigenerativa consiste nell'idea di utilizzare contemporaneamente una combinazione di numerosi approcci tecnologici, spesso convergenti, sia già esistenti che recentemente messi a punto. Quando possibile, questi nuovi approcci terapeutici dovrebbero limitarsi a stimolare e sostenere le capacità proprie di guarigione dell'organismo umano, includendo, senza limitazioni, l'uso di molecole solubili, terapie geniche, terapie basate sull'uso di cellule staminali e/o progenitrici, ingegneria tissutale e riprogrammazione cellulare e/o tissutale.

Nel primo simposio di ingegneria tissutale nel 1988 in California, fu formulata la seguente definizione: “L'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale” (2). Caratteristica principale dell'ingegneria tissutale è la multidisciplinarietà (ingegneria, chimica, fisica, biologia, biotecnologie e medicina) e la sua strategia principale si avvale di cellule viventi (e/o loro prodotti) e di supporti innovativi, per sviluppare sostituti tissutali bioattivi in alternativa agli impianti inerti. Gli studi iniziali cercarono

di riprodurre i tessuti e gli organi naturali nella forma, nelle proprietà e nella funzione ma, in poco tempo, fu evidente che la complessità dei tessuti biologici era tale da rendere quasi impossibile il passaggio dai sistemi *in vitro* a quelli *in vivo*. Durante la prima decade, quindi, si è approfondita la conoscenza sulle potenzialità dell'utilizzo di cellule, fattori biochimici e *scaffold* biocompatibili per la ricostruzione tissutale. Viste le difficoltà incontrate nel primo decennio, nel 1998 si è avuto il passaggio da ingegneria tissutale a ingegneria tissutale funzionale il cui obiettivo è ristabilire la funzione del tessuto o organo, identificando le esigenze meccaniche e strutturali del tessuto da ripristinare.

Rigenerazione ossea

Attualmente il trattamento chirurgico per perdite ossee estese si avvale di due alternative:

- Innesto di tessuto autologo; definito come *gold standard* per la rigenerazione, rappresenta una soluzione sicura per la compatibilità e l'assenza di risposta immunitaria, ma è anche disagiata per il paziente per la necessità di un secondo intervento e per il rischio di morbilità associato al prelievo. Inoltre è spesso difficile sopperire alla quantità di tessuto necessaria alla sostituzione della porzione mancante, o la qualità dell'osso recuperato non consente buoni risultati al reimpianto.
- Innesto di tessuto allogenico; grazie all'esistenza di banche dell'osso, è disponibile anche l'innesto di questa tipologia di tessuto, che tuttavia ha mostrato essere spesso soggetto a scarso rimodellamento e insufficiente rivascolarizzazione, funzionando quindi da mero supporto. Non sono da sottovalutare anche problematiche quali il rigetto e il rischio di infezioni legato all'impianto di tessuti di origine omologa.

La rigenerazione ossea si inserisce, quindi, come interessante prospettiva con due possibili modalità: la prima, *in vitro seeding*, dove le cellule del paziente si seminano sul biomateriale che viene posto in un bioreattore che simula l'ambiente biologico, creando condizioni colturali ottimali per la crescita cellulare. Il costrutto così ottenuto verrà poi impiantato nel paziente dove dovrebbe essere gradualmente riassorbito e sostituito da tessuti vitali grazie all'apporto vascolare e nervoso. Le applicazioni cliniche già in uso comprendono cartilagine, cute e sistema vascolare. La seconda, *in vivo (tissue guided regeneration)* modalità in cui la rigenerazione viene ottenuta direttamente nel paziente. Questo approccio associa agli *scaffold* materiali in forma di polveri, soluzioni o microparticelle caricate capaci di promuovere la riparazione locale. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare, come le *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), possono essere coniugate chimicamente al materiale e rilasciate nei tessuti a velocità controllata, per diffusione o frammentazione del supporto. Tali materiali bioattivi sono in grado di indurre localmente cellule dell'ospite a rilasciare fattori di crescita, che a loro volta stimolano cellule coinvolte nella rigenerazione del tessuto *in situ*.

Per la realizzazione del tessuto osseo sono, quindi, quattro gli elementi fondamentali:

1. le cellule (differenziate o staminali), che si dividono in autologhe (prelevate dallo stesso individuo su cui sarà eseguito l'impianto), allogeniche (provenienti da un donatore della stessa specie) e xenogeniche (ottenute da un donatore di un'altra specie);
2. i mediatori biochimici, cioè i fattori di crescita (es. *Epidermal growth factor*, *Fibroblast growth factor*, ecc.);
3. il bioreattore, ossia un dispositivo per colture cellulari che ha lo scopo di garantire l'apporto e il mantenimento di specifiche concentrazioni di nutrienti e gas:

4. lo *scaffold*. I biomateriali per gli *scaffold* dovrebbero idealmente essere: biocompatibili, biodegradabili, e favorire: adesione, migrazione, proliferazione, differenziamento cellulare, sintesi matrice extracellulare, invasione vascolare.

L'uso delle cellule staminali in medicina rigenerativa, presuppone il costante mantenimento delle loro proprietà di staminalità durante i prolungati periodi di proliferazione *in vitro*. I marcatori specifici dello stato indifferenziato sono fondamentali per controllare la stabilità **dei** fenotipi cellulari nel corso del tempo e confrontare le linee cellulari tra i diversi laboratori. Infatti, le linee di cellule staminali umane, coltivate per lunghi periodi di tempo, mostrano cambiamenti nella stabilità del cariotipo, espressione di marcatori di superficie cellulare, fattori di trascrizione e attività telomerasica (3, 4).

Negli ultimi anni diversi parametri sono stati caratterizzati per essere direttamente correlati alle funzioni delle cellule staminali e l'attività mitocondriale è stata considerata particolarmente importante per sostenere la vitalità cellulare. I mitocondri, infatti, non solo forniscono energia alle cellule con la maggior parte del loro ATP (*Adenosine TriPhosphate*) ma forniscono anche GTP (*GuanosinTriPhosphate*), oltre a controllare il turnover degli amminoacidi e realizzare la beta-ossidazione degli acidi grassi (5). Inoltre, questi organelli subcellulari, insieme al reticolo endoplasmatico, servono anche come un serbatoio di calcio cellulare. Alcuni studi recenti hanno analizzato l'attività mitocondriale e l'alterazione del tasso di consumo di ossigeno (6-11).

Negli ultimi anni sono stati ottenuti nuovi risultati interessanti e, in particolare, alcuni studi hanno documentato che ogni fase cellulare dipende da uno specifico stato metabolico (5, 12). Infatti, il metabolismo delle cellule staminali embrionali pluripotenti (*pluripotent Embryonic Stem Cells* – pESCs) si basa su un elevato livello di glicolisi, mentre durante la differenziazione cellulare il consumo di glucosio attraverso il percorso glicolico diminuisce e aumenta la fosforilazione ossidativa mitocondriale (6, 13, 14). Inoltre, durante la differenziazione delle cellule staminali, i mitocondri modificano il loro numero, la morfologia e la localizzazione (11, 13-15). È interessante notare che quando le cellule differenziate vengono trasformate in cellule staminali pluripotenti indotte (*induced Pluripotent Embryonic Stem Cells* – iPSCs), esse passano il loro metabolismo dalla fosforilazione ossidativa alla glicolisi (15), la cui inibizione blocca il processo di de-differenziazione (16). Alcune cellule staminali adulte, come le cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells* – MSC) e le cellule staminali ematopoietiche a lungo termine, richiedono un basso livello di ossigeno per mantenere condizioni indifferenziate. Queste cellule vivono in nicchie, in condizioni ipossiche e utilizzano principalmente la glicolisi per ottenere ATP, limitando quindi la produzione di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species* – ROS) e danni conseguenti a DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*) e RNA (*RiboNucleic Acid*) (13, 14).

La relazione tra il metabolismo aerobico e anaerobico è molto varia e complessa ma, pur con le dovute cautele, tutti questi risultati sembrano indicare che la pluripotenza cellulare (staminalità) è legata a una moderata attività di fosforilazione ossidativa legata alle condizioni ipossiche che cellule staminali continuano a vivere. Tuttavia, molti aspetti metabolici delle cellule staminali (sia delle cellule adulte che embrionali) non sono ancora ben compresi e, per questi motivi, non è sempre possibile ottenere cellule *in vitro* differenziate terminalmente dalle cellule progenitrici.

La determinazione di queste caratteristiche potrebbe aiutarci a stabilire se le cellule staminali siano in stato quiescente e quando sono pienamente in grado di differenziarsi. Questa conoscenza potrebbe permettere la scoperta dei legami dei profili metabolici con differenti marcatori di superficie delle cellule staminali (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166) e di segnalazione cellulare; in questo modo sarebbe possibile controllare le eventuali deviazioni dal comportamento normale delle cellule staminali in coltura permettendo l'eliminazione delle cellule difettose dannose per il perseguimento del differenziamento cellulare propedeutico alle applicazioni delle cellule staminali in medicina rigenerativa.

Tutte queste proprietà si ottengono grazie all'interazione tra cellule e biomateriale. Se le cellule, infatti, non riescono a riconoscere e a interagire con il substrato nessun processo successivo (proliferazione, migrazione e differenziamento cellulare) può avvenire (17-19). Pertanto nella progettazione di materiali per l'ingegneria dei tessuti, la comprensione dei meccanismi che regolano tale interazione sono di fondamentale importanza.

Le interazioni che possono instaurarsi tra cellula materiale possono essere di tipo elettrostatico o idrofobico ma da esse non derivano risposte biologiche. Affinché ciò avvenga, è necessario che l'interazione cellula-materiale porti alla trasduzione dei segnali in modo da indurre una risposta biologica (20). L'interazione deve quindi essere tra un ligando e un recettore in grado di stimolare le vie di trasduzione del segnale. L'adesione cellulare è un processo che si compie in due fasi: nella prima si ha la formazione dei legami (ionici e/o forze di Van der Waals) tra cellule e substrato; nella seconda, vengono coinvolte le proteine della matrice extracellulare (*Extra Cellular Matrix*) e del citoscheletro (21). Se consideriamo la situazione *in vivo*, infatti, la cellula riconosce l'ambiente che la circonda (cioè le proteine ECM) – e interagisce con esso. Da questa interazione deriva l'adesione e, quindi, una cascata di segnali intracellulari che permettono la crescita, la proliferazione e il differenziamento. La ECM, quindi, è coinvolta direttamente nella regolazione delle principali funzioni cellulari (20, 21).

Nella ECM sono presenti numerosi tipi di proteine, tra cui i proteoglicani e le proteine fibrose; all'interno di quest'ultima possiamo distinguere un gruppo con funzione strutturale (in cui si ritrovano collagene ed elastina) e un altro con funzione adesiva (fibronectina e laminina). Il sito di adesione cellulare è un sito di ancoraggio in cui le proteine della ECM si legano indirettamente all'actina del citoscheletro attraverso una complessa rete di proteine transmembrana chiamate integrine (22). Queste proteine svolgono numerose funzioni, da una parte, infatti, legandosi alle proteine della ECM, attivano numerose vie di trasduzione del segnale (sia le vie con recettori con attività di tirosina-chinasi, o serin-treonina chinasi, ecc.), dall'altra sono associate alle proteine del citoscheletro (actina, tensina, vinculina, ecc.) esse sono quindi in grado di integrare l'ambiente extracellulare con quello intracellulare, da cui il loro nome.

Le integrine sono una famiglia di glicoproteine eterodimeriche transmembrana, costituite da due subunità, α e β , unite con interazioni deboli (22). La maggior parte delle proteine della ECM, presenta una sequenza conservata dei tre amminoacidi Arg-Gly-Asp (*Arginylglycylaspartic acid*), RGD, che può interagire direttamente con le integrine, comunque, questo non è un motivo universale. Proprio a causa della fondamentale importanza che ha l'interazione cellula – biomateriale, ormai quest'ultimo non può più essere solo biocompatibile e biodegradabile quindi nella progettazione di un biomateriale bisogna considerare anche la presenza di segnali biochimici (bioattivazione). La bioattivazione si può indurre con trattamenti superficiali, o con l'introduzione nel materiale di molecole biologicamente attive (inclusi fattori di crescita, inibitori di crescita, fattori angiogenici e/o agenti immunosoppressori). La bioattivazione dei materiali più comunemente praticata attualmente avviene per mezzo di peptidi specifici legati covalentemente al materiale.

La conoscenza dei fattori coinvolti nell'adesione cellulare ha rappresentato un'importante evoluzione nella progettazione di biomateriali che consentano una modulazione del legame con le cellule.

Una superficie bioattivata può diventare paragonabile a una ECM in grado di fornire gli stimoli biologici adatti a guidare la formazione di nuovo tessuto permettendo adesione e specificità di interazione migliorando l'osteconduttività degli *scaffold*.

Bibliografia

1. Tosca MC, Marazzi M, Antonioli B, Galuzzi M, Mingotto F, Bertuzzi F, Aragona S, Scalise A. *Cellule staminali*. Bologna: Esculapio; 2016.
2. Fox C, Fred C, Skalak R. (Ed). *Tissue engineering*. Proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe. New York, USA: Liss; 1988.
3. Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, et al. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev* 2004;13(6):585-97.
4. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 2004;229(2):259-74.
5. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(4):243-56.
6. Cho YM, Kwon S, Pak YK, et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348(4):1472-8.
7. Lonergan T, Brenner C, Bavister B. Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence. *J Cell Physiol* 2006;208(1):149-53.
8. von Heimburg D, Hemmrich K, Zachariah S, Staiger H, Pallua N. Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells. *Respir Physiol Neurobiol* 2005;146(2-3):107-16.
9. Piccoli C, Ria R, Scrima R, et al. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem* 2005;280(28):26467-76.
10. Plotnikov EY, Marei MV, Podgornyi OV, Aleksandrova MA, Zorov DB, Sukhikh GT. Functional activity of mitochondria in cultured neural precursor cells. *Bull Exp Biol Med* 2006;141(1):142-6.
11. Lonergan T, Bavister B, Brenner C. Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion* 2007;7(5):289.
12. Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 2012;11(5):596-606.
13. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2011;9(4):298-310.
14. Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 2013;140(12):2535-47.
15. Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab* 2013;18(3):325-32.
16. Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* 2011 Aug 3;14(2):264-71.
17. Giancotti FG and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285(5430):1028-32.
18. Schoenwaelder SM and Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(2):274-86.
19. Humphries MJ and Newham P. The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol* 1998;8(2):78-83.
20. Zamir E and Geiger B. Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Science* 2001;114:3577-9

21. Zamir E and Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Science* 2001;114:3583-90
22. Schwartz MA, Schaller MD and Gisberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:549-99.

NANOMATERIALI E CELLULE STAMINALI PER LA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI DENTALI

Giovanna Orsini

Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Introduzione

I tessuti duri della corona dentale possono essere ripristinati utilizzando diversi materiali che sono stati migliorati con l'introduzione della nanotecnologia. Tuttavia, sebbene lo sviluppo di nuovi biomateriali abbia migliorato la qualità del trattamento, esistono numerosi limiti nella funzionalità e nella longevità dei restauri dentali. Per superare questo problema, sono emerse nuove idee e strategie dal campo dell'ingegneria tissutale e della biologia delle cellule staminali. Infatti, la rigenerazione dei tessuti dentali si basa sulla sostituzione e sul ripristino funzionale del tessuto danneggiato dallo stesso tessuto biologico sano. In questa presentazione, dopo una breve introduzione sulla formazione dei tessuti dentali, verranno esaminati: innovazioni nanotecnologiche dei materiali restaurativi, principi di ingegneria tissutale, potenziale rigenerativo delle cellule staminali dentali.

L'odontogenesi inizia in punti precisi dell'epitelio orale che si ispessisce e si invagina gradualmente nel mesenchima sottostante. Tale invaginazione, che acquisisce progressivamente forme caratteristiche, come lo stadio a gemma, a cappuccio e a campana, dà origine all'organo dello smalto, composto da quattro diverse popolazioni di cellule epiteliali: il reticolo stellato, lo strato intermedio, l'epitelio adamantino interno e l'epitelio adamantino esterno. Nello stadio a campana, il potenziale odontogeno viene acquisito dalle cellule mesenchimali della papilla dentale, da cui origina la polpa dentale. Le cellule della polpa, esposte all'epitelio adamantino interno, si differenziano in odontoblasti, capaci di formare dentina che, a loro volta, diventano necessari per il differenziamento in ameloblasti da parte delle cellule dell'epitelio adamantino interno. Gli odontoblasti sono cellule colonnari polarizzate dotate di lunghi prolungamenti, deputate alla produzione di matrice extracellulare dentinale che andrà poi incontro a maturazione. La matrice extracellulare dentinale è composta principalmente da collagene e da una piccola percentuale di proteine non collageniche, che rappresentano i fattori chiave per la deposizione di ioni minerali di apatite e la conseguente mineralizzazione. In seguito alla deposizione iniziale della dentina, gli ameloblasti si polarizzano e iniziano a produrre la matrice dello smalto, lungo la giunzione smalto-dentinale, composta da specifiche proteine idrofobiche tissutali, quali le amelogenine e le non amelogenine. Una volta deposto in tutto il suo spessore, lo smalto va incontro al processo di mineralizzazione, dando luogo al tessuto calcificato più duro e resistente del nostro organismo. Successivamente allo stadio a campana, avviene lo sviluppo della radice dentale con la conseguente formazione dei tessuti dell'apparato di sostegno dentale, quali legamento parodontale, cemento e osso alveolare. Dopodiché, nell'uomo, una volta avvenuta l'eruzione dentale, gli ameloblasti scompaiono e lo smalto non è più in grado di essere riparato.

Terapie attuali

Gli elementi dentali presentano una limitata capacità riparativa e rigenerativa a seguito di lesioni che causano danni ai tessuti duri, alla polpa e al tessuto parodontale. Negli ultimi anni, sono stati fatti progressi significativi nell'ambito dell'odontoiatria restaurativa, al fine di sviluppare nuovi approcci terapeutici, volti a colmare i limiti delle tecniche tradizionali, in termini di funzionalità e durata. Per sostituire i tessuti duri parzialmente persi, le tecniche contemporanee utilizzano restauri diretti o indiretti, eseguiti con materiali estetici biocompatibili, dello stesso colore del dente, come i compositi a base di resina e i manufatti protesici in ceramica. Questi materiali restaurativi sono stati resi più performanti ed estetici, con caratteristiche molto simili a quelle dei tessuti che vanno a sostituire, grazie alla loro implementazione a opera della nanotecnologia. Ad esempio, attraverso la creazione di microaggregazioni di nanoparticelle prepolymerizzate, i nuovi materiali compositi hanno acquisito delle migliori proprietà chimico-meccaniche, aumentando la loro durata a lungo termine. Anche il loro legame ai tessuti dentali è critico poiché mentre l'adesione allo smalto è stabile nel tempo, l'adesione alla dentina è più debole e instabile, principalmente a causa di una maggiore percentuale di matrice organica nella dentina stessa. Pertanto, l'obiettivo delle procedure adesive è la diffusa infiltrazione e impregnazione delle fibrille di collagene dentinale demineralizzato con la resina monomerica, presente nel sistema adesivo. Per migliorare le proprietà adesive della matrice dentinale, sono stati introdotti nuovi monomeri resinosi e varie strategie di biomodificazione, promuovendo una notevole resistenza alla degradazione dell'interfaccia adesiva.

I denti mancanti sono tradizionalmente sostituiti con protesi rimovibili, ricostruzioni fisse e impianti dentali. Gli impianti in titanio sono considerati come la migliore opzione per il trattamento delle *shh*, sebbene il loro successo sia influenzato dalla quantità e dalla qualità dell'osso mascellare e mandibolare. Recentemente, gli impianti dentali hanno beneficiato degli sviluppi della ricerca sulla biologia delle cellule staminali e sull'ingegneria tissutale, al fine di massimizzare il loro tasso di sopravvivenza in caso di scarsa qualità ossea. Nuove tecnologie rigenerative che utilizzano *scaffold*, cellule staminali, rilascio di farmaci e fattori di crescita, così come tecniche di terapia genica, dovrebbero migliorare la risposta del tessuto ospite e l'osteointegrazione dell'impianto.

La somministrazione in situ di cellule staminali in combinazione con *scaffold* e molecole bioattive potrebbe accelerare e aumentare il processo di riparazione dei tessuti dentali e dei tessuti di supporto che risultano compromessi. Sebbene la maggior parte degli studi si concentri sulla rigenerazione parziale del tessuto dentale, sono stati realizzati alcuni tentativi per la rigenerazione di interi denti.

Le cellule staminali svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi e nella riparazione dei tessuti. Il loro destino è regolato da fattori cellulari intrinseci e da segnali provenienti da un microambiente specializzato. Molti studi recenti hanno provato a isolare popolazioni di cellule staminali mesenchimali ed epiteliali da denti umani decidui e adulti.

Popolazioni di cellule staminali mesenchimali dentali (DMSC: *Dental Mesenchymal Stem Cells*) sono state isolate dalla polpa di denti permanenti (DPSC: *Dental Pulp Stem Cells*) e da decidui umani (SHED: *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous*). Le DMSC sono state identificate anche nella parte apicale della papilla dentale (SCAP: *Stem Cells from Apical Papilla*), nel follicolo dentale (DFSC: *Stem Cells from Dental Follicle*) e nel legamento parodontale (PDLSC: *Periodontal Ligament Stem Cells*).

Mentre i denti umani sono una buona fonte di DMSC, le cellule staminali epiteliali dentali (DESC: *Dental Epithelial Stem Cells*) sono molto rare, e le attuali conoscenze sulle DESC vengono ottenute da studi su incisivi di roditori, perché denti in continua crescita che conservano

una nicchia di cellule staminali da cui potranno originare i precursori delle cellule produttrici di smalto dentale).

Nuove prospettive nella rigenerazione dei tessuti dentali.

L'endodonzia rigenerativa ha come scopo quello di riformare il complesso pulpo-dentale lesionato, stimolando la capacità rigenerativa del tessuto pulpare, attraverso l'utilizzo di nanomateriali associati a fattori di crescita e cellule staminali. Sono già stati effettuati diversi esperimenti al fine di ottenere una completa rigenerazione del complesso pulpo-dentale in modelli animali, utilizzando DMSC umane. Una delle prospettive più promettenti è quella di utilizzare polpe dentali umane decellularizzate come *scaffold* naturali per ospitare DMSC autologhe associate a diversi fattori di differenziazione, in grado di guidare la neovascolarizzazione e la reinnervazione all'interno del tessuto rigenerato.

Un altro obiettivo fondamentale dell'odontoiatria rigenerativa è la ricostruzione di un parodonto funzionale nell'area compromessa attorno alla radice dentale, costituito da nuovo cemento, osso alveolare e legamento parodontale. Numerose ricerche *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che vari fattori di crescita, così come i derivati della matrice extracellulare dello smalto aiutano e promuovono la rigenerazione del tessuto parodontale. I moderni materiali da innesto osseo, con migliori proprietà fisico-chimiche, possono essere utilizzati come vettori di queste molecole, migliorando ulteriormente le prestazioni cliniche.

Infine, l'approccio terapeutico del futuro potrebbe consistere nella rigenerazione dell'intero elemento dentale. I possibili germi dentali artificiali sono stati sperimentalmente bioingegnerizzati, partendo dalla riassociazione di cellule staminali epiteliali e mesenchimali, che sono state disgregate da germi dentali embrionali di topo. I germi dentali bioingegnerizzati possono essere successivamente trapiantati nell'osso alveolare fino alla completa eruzione nella cavità orale, sostituendo così i denti mancanti. I denti creati dalla bioingegneria possiedono smalto e dentina, sono innervati e quindi potrebbero essere considerati come denti completamente funzionali. Tuttavia, è abbastanza difficile controllare *in vitro* la dimensione e la forma dei denti durante lo sviluppo di questi germi dentali artificiali. In effetti, i denti formati usando questo protocollo sperimentale risultano a volte più piccoli rispetto ai denti naturali. Quindi, la grande sfida è rappresentata proprio dalla possibilità di generare denti funzionali ingegnerizzati con l'appropriata morfologia coronale.

Bibliografia

1. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey P G, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:13625-30.
2. Mitsiadis T A, Orsini G, Jimenez-Rojo L. Stem cell-based approaches in dentistry. *Eur Cell Mater* 2015;30:248-57.
3. Monterubbianesi R, Orsini G, Tosi G, Conti C, Librando V, Procaccini M, *et al.* Spectroscopic and mechanical properties of a new generation of bulk fill composites. *Front Physiol* 2016;7:652.
4. Orsini G, Pagella P, Mitsiadis T A. Modern trends in dental medicine: an update for internists. *Am J Med* 2018;131:1425-30.
5. Orsini G, Pagella P, Putignano A, Mitsiadis TA. Novel biological and technological platforms for dental clinical use. *Front Physiol* 2018;9:1102.

SEZIONE 3
Biomateriali, rigenerazione tissutale
e tecnologie innovative
in odontostomatologia

RIGENERAZIONE TISSUTALE MEDIATA DA FATTORI BIOLOGICI E BIOFISICI

Massimo Corigliano

Scuola di Specializzazione in Chirurgia Implantare, Università di Sassari

Introduzione

La medicina rigenerativa in questo contesto temporale è sicuramente la parte più interessante e innovativa della medicina riabilitativa, ed è di supporto fondamentale alle tecniche di riabilitazione implantoprotesica nei pazienti atrofici o complessi.

In numerosi anni di studio e di ricerche, è stato redatto quello che viene identificato come il Protocollo Rigenerativo Multi Fattoriale (PRMF) e che è la base terapeutica per ogni terapia rigenerativa e riabilitativa (1-4).

Il PRMF nasce dalla necessità di potenziare le tecniche di rigenerazione tissutale in generale e ossea in particolare. In effetti pochi sono stati i veri progressi nelle tecniche di rigenerazione ossea guidata (GBR) o di implantoprotesi e il problema risale al fatto che ci sono degli errori di impostazione generale nella scelta delle tecniche e dei materiali utilizzati. Con il PRMF si parte dal presupposto che materiali e metodi devono avere una matrice totalmente naturale e, biologicamente e biofisicamente attiva. Inoltre, l'osso ricevente deve essere metabolicamente efficiente. Questo è fondamentale perché i processi rigenerativi, per attivarsi, devono sfruttare al massimo le potenzialità del tessuto ospite e tutte quelle tecnologie capaci di biostimolare e accelerare i processi rigenerativi e riparativi usando fonti energetiche e mediatori biochimici e biofisici che non incidano sui processi metabolici generando scorie o interferendo con gli stessi. Il segreto del PRMF risiede nel fatto che per la sua applicazione, non vengono utilizzati biomateriali di sintesi, ma solo tessuti autologhi freschi e vivi associati all'uso di mezzi fisici energeticamente stimolanti e a tecniche di drenaggio specifiche per questo tipo di terapia. Il PRMF è stato pubblicato e presentato in numerose occasioni e consessi scientifici, ma, per poterlo rendere fruibile e applicabile, necessita di molta esperienza rispetto i componenti biologici e tecnologici in uso.

Filosoficamente il PRMF può essere diviso in cinque parti fondamentali:

- la prima, che prevede la conoscenza anatomica e metabolica dell'osso unitamente a quella radiologica. Questo ci consente di intervenire con grande precisione ed efficienza sulle zone che debbono essere trattate, ma soprattutto, grazie alle tecnologie di diagnostica per immagini moderne e dei software dedicati, siamo in grado di simulare, e quindi di programmare, prima di eseguire l'intervento, tutte le manovre chirurgiche (5).
- la seconda, si avvale della riparazione ossea primaria, dell'Osteo-Neo-Genesi (ONG) utilizzando tecniche chirurgiche mininvasive e, per gli innesti, osso autologo vivo (6-24).
- la terza, prevede l'applicazione degli emocomponenti visti dal punto di vista biochimico come il *Blood Concentrated Growth Factors* (bCGF, fibrina polimerizzata) e la sua miscelazione con le componenti autologhe (37-38).
- la quarta, prevede l'applicazione di componenti visti dal punto di vista tecnico e biofisico. In questa parte ci soffermiamo soprattutto sulle problematiche dell'uso dei dispositivi biomedicali come laser, campi magnetici combinati, risonanza quantica molecolare, ozono ecc., cercando di ottenere per ogni possibilità terapeutica il miglior risultato possibile.

Le procedure chirurgiche sono progettate in condizioni che si esalti la mini-invasività delle nostre tecniche di microchirurgia (38-40).

- la quinta parte si occupa soprattutto delle tecniche Drenaggio Linfatico Manuale (DLM) e del mantenimento dei restauri e della gestione del rapporto col paziente, che oggi è forse la parte più difficile da organizzare (41).

Caso clinico

Paziente T.R., anni 63, stato di salute buono. Il paziente, bruxista e serratore cronico, è portatore di diversi restauri protesici fissi. Nel quadrante 4° l'eccessivo carico ha fratturato tre anni prima l'elemento pilastro 45 e non ha più provveduto alla sua sostituzione perché l'alveolo post-estrattivo non ha ultimato una reale riparazione ossea. Infatti, all'interno della cavità alveolare, si è formato un sistema riparativo simile a una fibrosi (Figura 1) dove è visibile come nel sito dentale 45 permane un settore post-estrattivo ancora non riparato.

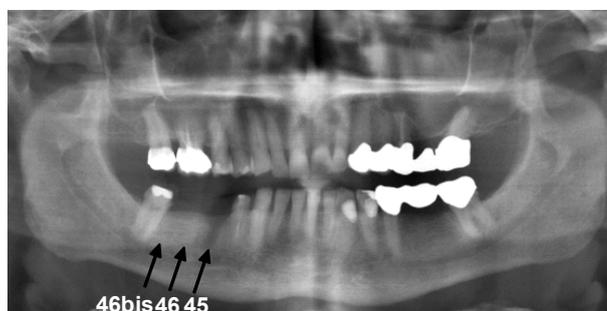


Figura 1. Immagine radiologica effettuata prima dell'impianto in cui si osserva l'edentulia dei siti dentali 45, 46 e 46bis. (Foto: Corigliano M., 2013)

È stato quindi programmato un intervento di impianto con applicazione di tre radici protesiche in zona 45, 46 e 46bis. Nella nostra tecnica, quando è possibile, si applicano sempre due radici protesiche in posizione 46 per simulare biomeccanicamente un dente a due radici. Intorno all'impianto, e nell'alveolo chirurgico, è stato applicato un innesto autologo di bCGF in zona 45 (Figura 2).



Figura 2. Immagine radiologica effettuata dopo l'impianto (Foto: Corigliano M., 2013)

Dopo 60 giorni è stata ripetuta la Tomografia Computerizzata *Cone Beam* (*Cone Beam Computed Tomography*, CBCT) che ha mostrato la completa riparazione ossea di tutti e tre i siti implantari (Figure 3 e 4); inoltre, in posizione coronale, si è apprezzata un'importante crescita ossea sul collo degli impianti (Figura 3, immagine a destra).

La riabilitazione coronale è stata ultimata con corone in metallo ceramica. Per evitare ulteriori danni da *overload*, il paziente è stato messo in un programma di protezione occlusale composto da *bite* di rilassamento e terapie logopediche.

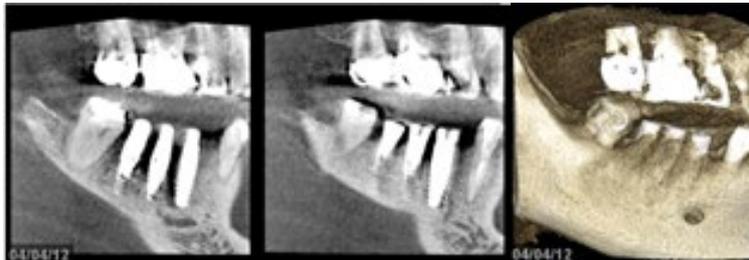


Figura 3. Immagini tomografiche sagittali dopo 60 gg dall'impianto (Foto: Corigliano M., 2013)

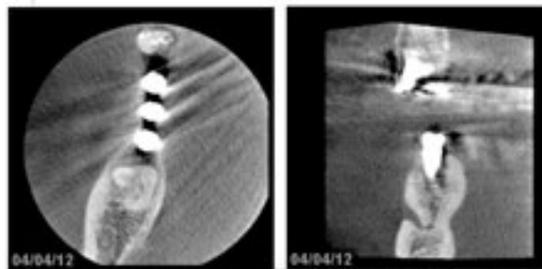


Figura 4. Immagini tomografiche dopo 60 gg dall'impianto dei siti impiantati con vista coronale (a sinistra) e con vista frontale (a destra) (Foto: Corigliano M., 2013)

Conclusioni

L'approccio multidisciplinare sicuramente rappresenta il futuro della terapia riabilitativa implantoprotetica. L'auspicio è quindi che, questo *modus operandi* risulti stimolante e utile a tutti i colleghi sia odontoiatri che ortopedici, e che ci avvicini tutti verso un sistema di terapia completo, semplice, sicuro, economico, più naturale e meno aggressivo possibile.

Bibliografia

1. Corigliano M, Cipollina A, Crescentini F, Baldoni E. *Prevention of BRONJ with physical and biotechnological therapies*. 88th. Boston, USA: IADR; 2010. p.64.
2. Corigliano M, Cipollina A, Crescentini F, Sacco L, Baldoni E. *the surgical multi-factorial protocol for bone and soft tissue regeneration*. 88th. Boston, USA: IADR; 2010. p. 28.

3. Cipollina A, Crescentini F, Corigliano M. Neo-Osteo-morfogenesi: utilizzo di laser e campi magnetici. *Dental Clinics* 2011;3:25-33.
4. Corigliano M, Re M, Donjeta D, Crescentini F, Cipollina A. Implantoprosthesis treatment in subject suffering from osteogenesis imperfecta with new multifactorial rehabilitation protocol. *J Craniofacial Surgery* 2015;26(3):996-7.
5. Corigliano M, Baldoni E. L'impianto post-estrattivo e l'osteoneogenesi (ONG): una moderna classificazione. Rho (MI): Quintessenza Edizioni; 2013.
6. Piattelli A, Favero GA, Scarano A, Corigliano M. Dalla ricerca alla clinica in osteointegrazione. Bologna: Edizioni Martina; 1996.
7. Sacco L, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M, Di Alberti L, Piattelli A. Bone reactions to immediately loaded single implants in monkeys. 35th ed. Leuven, Belgio: IADR/CED; 1999.
8. Corigliano M, Barlattani A, Gargari M, Ottria L, Andreana S. Primary healing in oral implantology. 37th ed. In: IADR ed. *Annual meeting of the Continental European Division of the IADR*. Boston, USA: IADR; 2001. p.193.
9. Demofonte F, Corigliano M, Barlattani A, Gargari M, Ottria L. Immediate load in implants inserted with flap-less surgery. 37th ed. In: IADR ed. *Annual meeting of the Continental European Division of the IADR*. Boston, USA: IADR; 2001. p. 195.
10. Corigliano M, Gargari M, Ottria L, Barlattani A. Early load on Bone Primary Healing Implants. 37th ed. In: IADR ed. *Annual meeting of the Continental European Division of the IADR*. Boston, USA: IADR; 2001. p. 195
11. Ottria L, Corigliano M, Barlattani A, Gargari M, Andrana S. Immediate implant placement and bone primary healing *in vivo* study. 37th ed. In: IADR ed. *Annual meeting of the Continental European Division of the IADR*. Boston, USA: IADR; 2001. p.196.
12. De Santis N, Corigliano M, Barlattani A, Gargari M, Ottria L, Dolci A. TMI, a new root form system oral implant. 37th ed. In: IADR ed. *Human studies and tissue regeneration*. Boston, USA: IADR; 2001. p. 197.
13. Tamburri F, Sanchez L, Allasia L, Bucci Sabattini V, Lotta C, Porro G, Zucco E, Barlattani A, Corigliano M. Valutazione e statistica a 6 anni della protesi radicolare osteoconnessa TMI a Riparazione ossea Primaria (ROP)–Parte 1. *Implantologia Dentale* 2005;2(3):132-41.
14. Tamburri F, Sanchez L, Allasia L, Bucci Sabattini V, Lotta C, Porro G, Zucco E, Barlattani A, Corigliano M. Valutazione e statistica a 6 anni della protesi radicolare osteoconnessa TMI a Riparazione ossea Primaria (ROP)–Parte 2. *Implantologia Dentale* 2005;(2):196-204.
15. Baldoni E, Corigliano M, Porro G, Cammarata L, Armellin E. Le protesi Radicolari a Riparazione Ossea Primaria (ROP) –Parte 1. *Implantologia Dentale* 2006;3(2):50-8.
16. Baldoni E, Corigliano M, Porro G, Cammarata L, Armellin E. Le protesi Radicolari a Riparazione Ossea Primaria (ROP) –Parte 2. *Implantologia Dentale* 2006;3(3):100-6.
17. Corigliano M, Cammarata L, Porro G, Baldoni E. La necrosi ossea perimplantare, come viene prodotta e come evitarla–Parte 1. *Implantologia dentale* 2006;3(4):153-60.
18. Corigliano M, Cammarata L, Porro G, Baldoni E. La necrosi ossea perimplantare, come viene prodotta e come evitarla–Parte 2. *Implantologia dentale* 2006;3(5):240-5.
19. Corigliano M, Cammarata L, Porro G, Baldoni E. Avoiding Alveolar Nerve Technique (AANT): possibilità terapeutiche. *Implantologia* 2007;2:7-13.
20. Corigliano M, Puzilli D, Pilloni A, Baldoni E. La disgiunzione crestale FBET in implantoprosi: valutazioni e limiti –Parte 1. *Implantologia Dentale* 2007;4(3):124-8.
21. Corigliano M, Puzilli D, Pilloni A, Baldoni E. La disgiunzione crestale FBET in implantoprosi: valutazioni e limiti –Parte. *Implantologia Dentale*;2008;160-4.

22. Corigliano M, Rossi S, Carpio AM, Di Carlo S. Histologic evaluation of a P.B.R. implant system: study in man. In: IADR ed. *Human studies and tissue regeneration*. Boston, USA: IADR; 2008.
23. Corigliano M, Rossi S, Crescentini F, Giovannetti A, Di Carlo S. Osteoneomorphogenesis biostimulated by combined magnetic field. *Human studies and tissue regeneration*. Boston, USA: IADR. 2008.
24. Rossi S, Corigliano M, Di Carlo S, Pompa G. The immediate load in a post-extractive implant. In: IADR ed. *Human Studies and Tissue Regeneration*. Boston, USA: IADR. 2008.
25. Corigliano M, Baldoni E, Cipollina A. Physical therapies and primary bone reparation in implantoprosthesis. *Simulation and Drugs Study. ABS: 1235. IADR General session*. Toronto: Metro Toronto Convention Centre Exhibit Hall D-E; 2008.
26. Corigliano M, Cammarata L, Mantarro M. La terapia magneto elettrica nel corso postoperatorio implantoprotesico. In: SIBE ed. *Le applicazioni terapeutiche delle teorie biofisiche in medicina. Case report nelle varie specialità mediche. Convegno Nazionale Società Italiana Biofisica Elettrodinamica*. II° ed. Bologna: SIBE; 2007. p. 6-10.
27. Cipollina A, Crescentini F, Corigliano M. Importanza dei campi magnetoelettrici complessi nella gestione delle complicanze in ortopedia maxillo-mandibolare. In: SIBE ed. *Atti III Congresso SIBE*. Bologna: SIBE; 2010. p. 3-6.
28. Corigliano M, Cipollina A, Crescentini F. I campi magnetici complessi combinati alla chirurgia orale e osteorigenerazione. Procedure chirurgiche e risultati clinici nel quadro del PCMF. Studio su 1200 pazienti. In: SIBE ed. *Atti III Congresso SIBE*. Bologna: SIBE; 2010. p. 7-12.
29. Crescentini F, Cipollina A, Corigliano M. Relazione tra patologie e protocolli terapeutici nei trattamenti con campi magnetici ultradeboli complessi. In: SIBE ed. *Atti III Congresso SIBE*. Bologna: SIBE; 2010. p. 13-18.
30. Crescentini F. *La neo-osteomorfogenesi guidata con i CMF – Combined Magnetic Fields*. Macerata: Simple edizioni; 2010.
31. Cipollina A, Crescentini F, Corigliano M. Importanza dei campi magnetoelettrici complessi nella gestione delle complicanze in ortopedia maxillo-mandibolare. In: SIBE (Ed). *Atti III Congresso SIBE*. Bologna: SIBE; 2010. p. 3-6.
32. Corigliano M, Cipollina A, Crescentini F. I campi magnetici complessi combinati alla chirurgia orale e osteorigenerazione. Procedure chirurgiche e risultati clinici nel quadro del PCMF. Studio su 1200 pazienti. In: SIBE (Ed). *Atti III Congresso SIBE*. Bologna: SIBE; 2010. p. 7-12.
33. Crescentini F, Cipollina A, Corigliano M. Relazione tra patologie e protocolli terapeutici nei trattamenti con Campi Magnetici ultradeboli Complessi. In: SIBE ed. *Atti III Congresso SIBE*. Bologna: SIBE; 2010. p. 13-18.
34. Corigliano M, Cipollina A, Crescentini F, Sacco L, Baldoni E. *Concentrated Growth Factors (CGFs) in the restorative tissue techniques*. 88th ed. Boston, USA; 2010. p. 233.
35. Corigliano M, Sacco L, Baldoni E. CGF una proposta terapeutica. *Odontoiatria* 2010;1:69-81.
36. Corigliano M, Re M, Cipollina A, Crescentini F, Fioravanti C, Baldoni E. Fattori di crescita circolanti: un concreto supporto al Protocollo Rigenerativo Multi Fattoriale (PRMF). *Teamwork Clinic* 2012;4(14):38-55.
37. Cipollina A, Crescentini F, Corigliano M, Giacalone A. Il laser er: yag nella chirurgia ossea della cresta edentula atrofica. *Dental Clinics* 2011;2(5):17-22.
38. Cipollina A, Corigliano M, Crescentini F. Biphosphonate-related osteonecrosis of jaw: a surgical impact trough no linear lbo laser and uktraweak multifrequency complex magnetic fields. In: *Laser in Medical Science*. Atti del congresso WFLD-Int J. Berlino: Springer; 2011.

39. Cipollina A, Corigliano M, Crescentini F. Biphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: a low surgical impact through non linear LBO laser and ultraweak Multifrequency Complex Magnetic Fields. *Photomedicine and Laser Surgery* 2012,30(8):466-505.
40. Corigliano M, Bevilacqua M, Sforzina P, Baldoni E. La sindrome compartimentale in odontoiatria – Parte I. *Implantologia Dentale* 2007;4(1):20-9.
41. Corigliano M, Bevilacqua M, Sforzino P, Baldoni E. La sindrome compartimentale in odontoiatria – Parte II. *Implantologia Dentale* 2007;4(2):78-83.

PROCEDURE DI RIGENERAZIONE OSSEA: BIOMATERIALI A CONFRONTO NEL GRANDE RIALZO DI SENO MASCELLARE

Antonio Scarano

*Dipartimento di Scienze Mediche Orali e Biotecnologie, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università
G. D'Annunzio di Chieti e Pescara, Chieti*

Introduzione

L'elevata percentuale di successi ottenuta in pazienti riabilitati con impianti osteointegrati ha determinato un interesse della ricerca verso metodiche via via più raffinate, che mirano alla possibilità di inserire impianti in zone dove vi sia una insufficiente quantità d'osso. A livello del mascellare superiore, ciò viene riscontrato più frequentemente, nei pazienti edentuli o parzialmente edentuli da molto tempo, poiché l'assenza di denti provoca l'espansione dell'antro di Hignoro da un lato e il riassorbimento del processo alveolare edentulo dall'altro. Negli anni '60, Linkow (1), dimostrò la possibilità di introdurre degli impianti a lama nel seno mascellare, sollevando parzialmente la membrana di Schneider senza lacerarla. Tatum nel 1977 propose di sollevare la membrana sinusale, eseguendo una Caldwell-Luc modificata e inserendo, come materiale da innesto, osso autologo prelevato in sede costale o dalla cresta iliaca (2). Questa tecnica non trovò grandi applicazioni cliniche principalmente perché era necessario sottoporre il paziente a un secondo intervento chirurgico, ricorrendo all'anestesia generale. Negli anni successivi, Boyne e James (3) misero a punto la tecnica di rialzo di seno mascellare e Misch *et al.* (4) apportarono delle modifiche. Uno degli obiettivi di questa procedura era la formazione di osso vitale, per avere l'osteointegrazione di impianti dentali, posizionati contemporaneamente o successivamente alle procedure rigenerative. Vari materiali sono stati utilizzati per il rialzo di seno mascellare, con elevate percentuali di successo degli impianti inseriti nelle aree trattate (5-6); tuttavia pochi studi (7-8) hanno messo in evidenza la quantità e la qualità dell'osso rigenerato, fondamentali per l'osteointegrazione degli impianti posizionati. Il materiale da innesto, utilizzato in questa procedura, dovrebbe essere totalmente riassorbibile ed essere sostituito da osso vitale (9). I biomateriali maggiormente utilizzati sono: osso autologo (frammenti ossei prelevati dalla cresta iliaca, dalla mandibola, dalla tuberosità mascellare); sostituti ossei quali tricalcificosfati (10), osso spugnoso disidratato, demineralizzato o congelato, idrossiapatite porosa, osso bovino inorganico, proteine osteoinduttive o più spesso una combinazione di questi materiali con risultati clinici soddisfacenti. (11-15) Il materiale maggiormente utilizzato e giudicato il *gold standard* è l'osso autologo, prelevato sia da zone intraorali che extraorali (16-19). L'uso dell'osso autologo presenta, tuttavia, degli svantaggi: la quantità prelevabile da siti intra-orali è limitata ed è per questo che trova scarse indicazioni nel rialzo di seno mascellare. Per reperire una maggiore quantità di osso si sono sviluppate tecniche chirurgiche che prevedono il prelievo di osso da siti extra-orali. Queste tecniche, tuttavia, non sono scevre da rischi post-operatori, rendendo più difficile l'approccio psicologico con il paziente, che deve essere sottoposto a un secondo intervento chirurgico. Da non sottovalutare inoltre che l'incidenza di complicazioni post-chirurgiche del sito donatore ammontano al 10% (17, 20) e che si ha comunque una quota non trascurabile e variabile di riassorbimento dell'innesto autologo nel rialzo di seno mascellare (21).

L'obiettivo di questo studio è di valutare istologicamente il destino delle particelle di biomateriale utilizzate nel grande rialzo di seno mascellare.

Materiali e metodi

Sono state utilizzate sei carote ossee per ogni tipo di biomateriale prelevate da pazienti sottoposti a intervento di grande rialzo di seno mascellare. Tutti i pazienti avevano un'età media di 43 anni e erano esenti da patologie sistemiche di particolare rilevanza, non fumatori, si presentavano in condizioni di buona salute parodontale e con edentulia parziale dei settori postero-superiori. I siti oggetto dello studio presentavano un'altezza ossea residua < 5 mm.

I prelievi, eseguiti con una fresa carotatrice con diametro interno di 2 mm e dopo 8 mesi dall'innesto, sono stati fissati in formalina al 10%, disidratati in una scala di alcool a gradazione crescente, quindi inclusi in resina LR White ("London Resin, Berkshire, UK"). I campioni biologici sono stati sezionati lungo l'asse maggiore, tramite un sistema di taglio con disco diamantato, in modo da ottenere dei preparati di 200 micron di spessore. Le sezioni ottenute sono state portate a uno spessore di 50 micron mediante un sistema di microabrasione ("Precise 1 Automated System" by Assing Roma). Infine, previa levigatura, sono state colorate con blu di toluidina e fucsina acida e osservate al microscopio ottico a luce trasmessa e polarizzata (Leitz Laborlux, Germania). L'analisi istomorfometrica è stata eseguita utilizzando un computer AMD 1800 Mhz, interfacciato con una scheda video digitalizzatrice a colori reali con ingresso RGB, (Matrix Vision GmbH), una telecamera a colori 3CCD (*Charge-Coupled Device*) e un applicativo software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc. Immagini & Computer Snc Milano). Le immagini acquisite sono state analizzate, utilizzando il software menzionato in precedenza, ed è stata calcolata la quantità di osso mineralizzato, la quantità di biomateriale residuo e la quantità di spazi midollari.

Risultati istologici

Osso autologo

L'osso autologo, prelevato da ossa intraorali ed extra-orali e successivamente innestato, istologicamente si presenta con un aspetto simile a quello dell'osso ospite.

Osservando una biopsia di tessuti duri, contenente osso autologo, si osserva che tutte le particelle sono circondate da nuovo osso. Da ciò si può dedurre che l'osso innestato si comporta come un materiale osteoconduttivo.

L'osso autologo è considerato il miglior materiale da innesto, per tale motivo riteniamo utile sottolineare le differenze esistenti con altri biomateriali.

La differenza più significativa con i materiali artificiali (idrossiapatite, Biocoral) consiste nel fatto che la particella circondata da nuovo osso è vitale, mentre le differenze esistenti con l'osso mineralizzato sembrano essere veramente minime. L'esame istomorfometrico dimostra che la percentuale di osso neoformato è del 42%, gli spazi midollari rappresentano il 40%, mentre l'osso autologo residuo il 18%.

Osso demineralizzato

La demineralizzazione e il *freeze-drying* del materiale osseo da innesto determinano l'eliminazione della componente mineralizzata e la liberazione delle BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) che inducono la differenziazione di cellule mesenchimali in osteoblasti, aumentandone così le potenzialità osteogenetiche.

Le particelle di osso demineralizzato che si trovano localizzate vicino all'osso preesistente sembrano partecipare all'attività osteogenetica, mentre le particelle localizzate a distanza maggiore non mostrano segni di processi di rimineralizzazione od osteogenesi.

In altre zone è possibile osservare come particelle ancora non rimineralizzate si trovano all'interno dell'osso neoformato, prodotto da osteoblasti in fase attiva. Fenomeni di rimineralizzazione sono presenti all'interfaccia tra l'osso neoformato e la matrice demineralizzata. All'interno della matrice demineralizzata sono presenti nuclei di mineralizzazione, i quali tendono a fondersi tra loro, facendo assumere alla particella di osso demineralizzato una colorazione simile all'osso normale. In qualche caso la particella di osso demineralizzato è completamente circondata da osso neoformato. Le trabecole di osso neoformato mostrano differenti aspetti microscopici: alcune hanno un aspetto di osso lamellare osteonico maturo, mentre in altre erano presenti aspetti di tessuto mineralizzato distrofico, non lamellare, simile alla dentina interglobulare e con presenza di ampie lacune osteocitiche. Le particelle di DFDBA (*Demineralized Freeze Dried Bone Allograft*) possono determinare una risposta infiammatoria, sono scarsamente riassorbibili vanno incontro a una parziale mineralizzazione. L'esame istomorfometrico dimostra che la percentuale di osso neoformato è del 29%, gli spazi midollari rappresentano il 37%, mentre le particelle di DFDBA rappresentano il 34%.

Bio-Oss

Il Bio-Oss rappresenta un biomateriale di origine ossea bovina la cui la matrice organica è stata denaturata ed eliminata, rimane soltanto la porzione mineralizzata.

La maggior parte del biomateriale appare circondato da osso neoformato. Le lacune osteocitarie presenti nelle particelle disposte più perifericamente sembrano essere sempre riempite da osteociti, mentre nelle particelle disposte in una zona più centrale, all'interno delle lacune osteocitarie, si osservano cellule con caratteristiche morfologiche differenti dagli osteociti; solo in alcuni casi le lacune osteocitarie appaiono vuote.

Mancano spazi otticamente vuoti all'interfaccia tra osso neoformato e Bio-Oss.

Dalle osservazioni istologiche si evince come il bio-oss sia un materiale scarsamente riassorbibile.

Studi a lungo termine eseguiti sul rialzo del seno mascellare mettevano in evidenza la scarsa riassorbibilità del materiale. L'esame istomorfometrico dimostra che la percentuale di osso neoformato è del 39%, gli spazi midollari rappresentano il 34% mentre il bio-oss residuo è del 27%.

Idrossiapatite

L'idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{P}_04)(\text{OH})_2$ nella sua forma naturale, estratta dai coralli marini, è molto porosa; viceversa le forme sintetiche sono ceramiche la cui porosità e solubilità chimica risultano molto ridotte e possono essere controllate alla produzione.

La maggior parte delle particelle di idrossiapatite sono circondate da osso. In alcune zone le particelle sembrano essere cementate da osso neoformato di spessore variabile. Piccoli spazi

midollari sono presenti tra le particelle e, all'interno di questi spazi, si osservano cellule mesenchimali e alcuni capillari. L'esame istomorfometrico dimostra che la percentuale di osso neoformato è del 41%, gli spazi midollari rappresentano il 30%, mentre l'idrossiapatite residua è del 31%.

Biocoral

Il Biocoral è costituito soprattutto da carbonato di calcio sotto forma di aragonite (97-98%), stronzio, fluoruro, magnesio, sodio, potassio. Possiede una porosità di più del 45%, con pori di circa 150 µm di diametro.

Le particelle di Biocoral sono unite da tessuto osseo neoformato. All'interfaccia tra Biocoral e osso neoformato non è possibile osservare la presenza di spazi otticamente vuoti. In alcune porzioni, dalla superficie del granulo di Biocoral si riscontrano delle aree di riassorbimento.

La formazione di osso sembra iniziare direttamente sulla superficie esterna del biomateriale: in alcuni casi, vicino alle particelle del biomateriale, è possibile osservare la presenza di cellule mesenchimali che si trasformano in pre-osteoblasti e osteoblasti e la presenza di matrice osteoide.

In nessun campo si individuano cellule infiammatorie.

Occasionalmente sono presenti piccoli capillari negli spazi midollari che si trovavano tra le particelle.

L'esame istomorfometrico dimostra che la percentuale di osso neoformato è del 42%, gli spazi midollari rappresentano il 40%, mentre il biomateriale residuo il 18%.

Biovetri

I Biovetri (BV) sono costituiti da particolari granuli di vetro attivo e amorfo, di 300-350 micron di diametro, costituiti a loro volta dal 45% in SiO₂, dal 24,5% in CaO, dal 24,5% in NaO₂ e dal 6% in P₂O₅, conosciuti come 45S5. Il BV diventa adesivo dopo essere venuto a contatto col sangue, il che ne facilita la manipolazione e può essere applicato direttamente nel sito del difetto o mischiato precedentemente al sangue del paziente.

Le particelle di biovetri si presentano circondate da osso neoformato e l'osservazione a forte ingrandimento dell'interfaccia osso-biovetro non ha rivelato nessuno spazio otticamente vuoto, tanto che alcune volte è impossibile distinguere la particella dall'osso a contatto con essa.

L'osso neoformato unisce tutte le particelle tra loro. In nessun campo si è osservata la cavitizzazione delle particelle con neoformazione di osso, che viene invece a formarsi attorno alle porzioni più esterne dei granuli. L'esame istomorfometrico dimostra che la percentuale di osso neoformato è del 40%, gli spazi midollari rappresentano il 43% mentre l'osso autologo residuo 18%.

Fisiograft

Si tratta di un materiale sintetico, riassorbibile formato da un polimero di acido polilattico e poliglicolico, che viene degradato nel giro di 50-60 giorni. Nelle biopsie è presente osso corticale, maturo, con segni di rimodellamento nel terzo apicale, mentre nella parte centrale e apicale osso più trabecolare. In alcune aree è possibile osservare osso non ancora mineralizzato. Non è stata osservata la presenza di infiltrato infiammatorio. Al rientro chirurgico, le particelle del materiale innestato non venivano identificate e anche l'istologia mostrava che il materiale era completamente riassorbito. L'analisi istomorfometrica mette in evidenza una percentuale di osso

mineralizzato di 43%, una percentuale di Fiosiograft del 1%, quindi gli spazi midollari rappresentavano il 56%.

PepGen/P-15

Il PepGen/P-15 è una nuova combinazione di matrice di HA derivata da osso bovino naturale anorganico a cui è adsorbito un peptide sintetico capace di legare cellule, che inoltre si è dimostrato in grado di migliorare i risultati in difetti parodontali infraossei. L'HA porosa derivata dall'osso bovino ha delle dimensioni di 250-420 micron. La matrice con il peptide emula le proprietà del collagene nel promuovere il legame, la migrazione e la differenziazione cellulare. In realtà si è visto che P-15 promuove il legame e la proliferazione dei fibroblasti del legamento parodontale sulle particelle di HA naturale e sintetica e permette la migrazione delle stesse su gel di agarosio. Istologicamente la maggior parte delle particelle di P-15 trovate insieme all'osso neoformato, non mostrano segni di riassorbimento e sono completamente circondate da osso maturo. L'osso è in diretto contatto con le particelle del biomateriale e non sono presenti gap tra il PepGen/P-15 e l'osso. Manca il reperimento di un'infiltrato infiammatorio o di cellule multinucleate intorno alle particelle di biomateriale. L'analisi istomorfometrica mette in evidenza una percentuale di osso mineralizzato di 40%, una percentuale di PepGen del 23%, quindi gli spazi midollari rappresentavano il 37%.

Solfato di calcio

L'osservazione a piccolo ingrandimento, mette in evidenza tessuto osseo neoformato con ampie cavità osteocitarie. In alcuni campi si osservano dei piccoli residui di solfato di calcio, di aspetto grigio scuro, circondati da osso o da cellule ad attività fagocitaria. Si notano anche depositi di fosfato di calcio che appaiono come delle zone diffuse colonizzate da cellule presumibilmente mesenchimali e da fluidi biologici. In nessun campo si riscontrano cellule infiammatorie. L'osservazione dei preparati istologici in luce polarizzata permette di valutare meglio i piccoli residui delle particelle di solfato di calcio che presentano una caratteristica birifrangenza.

L'analisi istomorfometrica mette in evidenza una percentuale di osso mineralizzato di 48%, una percentuale di solfato di calcio del 13%, quindi gli spazi midollari rappresentavano il 39%.

Discussione

Nessuna differenza è stata riscontrata clinicamente con l'utilizzo dei diversi biomateriali. I numerosi studi clinici mettono in evidenza una percentuale alta di sopravvivenza degli impianti inseriti in osso rigenerato con i diversi biomateriali. Al fine di chiarire l'utilità di un biomateriale nella rigenerazione ossea è stato scelto il grande rialzo di seno mascellare, in quanto risulta molto difficile comparare la guarigione ossea nelle altre situazioni cliniche.

In tutti i prelievi è stato osservato osso neoformato, che unisce le particelle dei vari biomateriali; ciò sta a significare che nessun biomateriale preso in considerazione ha inibito la neoformazione ossea.

Tuttavia i fenomeni di neoformazione ossea non sono sufficienti a chiarire l'utilità di un biomateriale rispetto a un altro. Sono state prese in considerazione la quantità di osso mineralizzata, la quantità di spazi midollari e la quantità di biomateriale residuo. Prendendo in considerazione questi parametri si riscontrano delle differenze tra i vari biomateriali. In modo particolare per ciò che riguarda la quantità di biomateriale residuo. Il Fiosiograft risulta il

biomateriale più riassorbibile, seguito dal solfato di calcio, dai biovetri, dal biocoral, idrossiapatite, PepGen, Bio-Oss e DFDBA.

Bibliografia

1. Linkow LI. Maxillary implants. A dynamic approach to oral implantology. North Haven, CT: *Glarus* 1957;109-11.
2. Tatum OH. JR. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dental Clinics of North America* 1989;30:207-29.
3. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *Oral Surgery* 1980;38:613-16.
4. Misch CE, Dietsch F. Bone grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 1993;2:158-62.
5. Kamm T, Kamm S, Heptt W. Bone substitutes used for sinus lift. *HNO* 2015;63(7):481-8.
6. Esposito M, Grusovin MG, Rees J, Karasoulos D, Felice P, Alissa R, Worthington H, Coulthard P. Effectiveness of sinus lift procedures for dental implant rehabilitation: a cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol* 2010;3(1):7-26.
7. Iezzi G, Piattelli A, Giuliani A, Mangano C, Manzon L, Degidi M, Iaculli F, Scarano A, Filippone A, Perrotti V. Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of bone grafting materials and membranes during maxillary sinus-lift procedures. Part 1: A General Overview. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18(1):19-32.
8. Iezzi G, Piattelli A, Giuliani A, Mangano C, Barone A, Manzon L, Degidi M, Scarano A, Filippone A, Perrotti V. Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of bone grafting materials and membranes during maxillary sinus-lift procedures. Part 2: Detailed Characteristics of the Materials. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18(1):33-44.
9. Mangano C, Piattelli A, Scarano A, Martinetti R. L'idrossiapatite in chirurgia orale. Torino: UTET editore; 1998.
10. Meyer C, Vhatelain B, Benarroch M, Garnier JF, Ricobourg B, Camponovo T. Massive sinus-lift procedures with beta-tricalcium phosphate: long-term results. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2009;110(2):69-75.
11. De Castilho TR, Tortamano P, Marotti J, de andrere JC Jr, Vhilvarquer I, Ximenez me, Alves MT. Clinical and histomorphometric evaluation of fresh frozen bone allograft in sinus liftsurgery. *Clin Implant Dent Relat Res* 2016;18(1):40-50.
12. Meloni SM, Jovanovic SA, Pisano M, Xhanari E, De Riu G, Tullio A, Tallarico M. Sinus lift grafting with anorganic bovine bone vs 50% autologous bone mixed with 50% anorganic bovine bone: 2 years after loading results from a randomised controlled trial. *Eur J Oral Implantol* 2017;10(4):425-32.
13. AlGhamdi AS. Osteotome maxillary sinus lift using bovine bone and calcium sulfate: a case series. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15(2):153-9.
14. Ricket D, Slater JJ, Meijer HJ, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review. *Int J oral Maxillofac Surg* 2012;41(2):160-7.
15. Galindo-Moreno P, de Buitrago JG, Padiál-Molina M, Fernandez-Barbero JE, Ata-Ali J, O Valle F. Histopathological comparison of healing after maxillary sinus augmentation using xenograft mixed with autogenous bone versus allograft mixed with autogenous bone. *Clin Oral Implants Res* 2018;29(2):192-201.
16. Wood RM, Moore DL. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988; 3:209-14.

17. Kline RM, Wolfe SA. Complications associated with the harvesting of cranial bone grafts. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1995;95:5-13.
18. Block MS, Kent JN. Simultaneous placement of hydroxyapatite-coated implants and autogenous bone grafts. In: Jensen OT ed. *The sinus bone graft—1st edition*. Chicago: Quintessence Publishing; 1999. p. 129-43.
19. Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent* 2017;3(1):23.
20. Schmitt CM, Moest T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Anorganic bovine bone (ABB) vs. autologous bone (AB) plus ABB in maxillary sinusgrafting. A prospective non-randomized clinical and histomorphometrical trial. *Clin Oral Implants Res* 2015;26(9):1043-50.
21. Klijn RJ, van den Beucken JJ, Bronkhorst EM, Berge GJ, Jansen JA. Predictive value of ridge dimensions on autologous bone graft resorption in staged maxillary sinus augmentation surgery using Cone-Beam CT. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(4):409-15.

NUOVE PROSPETTIVE NELLA RIGENERAZIONE GUIDATA DELL'OSSO CON DISPOSITIVI BARRIERA IN TITANIO CUSTOMIZZATI

Mirko Andreasi Bassi

Odontoiatra, libero professionista, Roma

L'atrofia ossea conseguente alla perdita degli elementi dentari nei settori latero-posteriori della mandibola costituisce una limitante a corretto posizionamento implantare in particolare nel caso di atrofie prevalentemente verticali o di tipo combinato verticale/orizzontale (1).

Spesso il segmento osseo atrofico necessita dell'adozione di una procedura di aumento osseo.

Ci sono molte tecniche descritte in letteratura, finalizzate alla ricostruzione di creste alveolari atrofiche, che sono sia operatore- che tecnica- sensibili. Per questi casi è spesso necessario l'utilizzo di un innesto autogeno a *onlay* oppure a *inlay* di tipo interposizionale (2). L'osso autologo ha il vantaggio di essere osteoconduttivo oltre che osteogenico e osteoinduttivo, ma di contro aumenta il tempo chirurgico, crea un secondo sito chirurgico e può causare complicazioni e morbidità. In caso di grave atrofia, inoltre può essere necessario prelevare osso autologo da siti extraorali (es. cresta iliaca) rendendo l'operazione non fattibile in ambiente ambulatoriale. Studi riguardanti la rigenerazione ossea guidata (*Guided Bone Regeneration*, GBR), in comparazione alle altre metodiche di aumento osseo disponibili, sembrano fornire risultati prevedibili e favorevoli, supportati da follow-up a lungo termine, in particolare se eseguite con membrane non riassorbibili in Politetrafluoroetilene espanso (e-PTFE) rinforzato con un *framework* di titanio (3).

Attualmente il materiale da innesto maggiormente utilizzato, in associazione con i dispositivi per la GBR, è rappresentato dall'osso autologo miscelato con uno xenoinnesto (osso bovino deproteinizzato) (1). Le membrane vengono utilizzate nella GBR per impedire la crescita competitiva di tipologie cellulari indesiderate (es. epitelio e tessuto connettivo molle) consentendo ripopolamento della ferita da parte delle cellule ossee. Gli obiettivi di questo tipo di dispositivi sono:

- mantenimento dello spazio;
- protezione del coagulo;
- effetto barriera;
- inibizione del riassorbimento dell'innesto;
- stabilizzazione dell'innesto (4, 5).

Per questi motivi l'aumento osseo verticale viene solitamente eseguito con membrane non riassorbibili in e-PTFE in titanio rinforzato, in modo che l'effetto barriera possa durare fino al secondo intervento chirurgico di rientro, che avviene, di norma, dopo almeno 6 mesi dal primo intervento (6).

Attualmente è stato proposto il PTFE denso (d-PTFE) come membrana non riassorbibile.

Questo materiale, nello stesso modo del e-PTFE, può essere vantaggiosamente utilizzato in combinazione con un *framework* di titanio per dare malleabilità e stabilità al dispositivo (7- 9).

La favorevole affidabilità clinica del d-PTFE ha mostrato che una delle principali caratteristiche insospettite di questa membrana è quella della completa impermeabilità, tale da impedire la contaminazione batterica dell'innesto, in caso dell'indesiderata esposizione del dispositivo, nel cavo orale, nel periodo postoperatorio (10, 11).

Gli attuali orientamenti prevedono l'inserimento implantare simultaneo, al fine di ridurre sia il numero di interventi chirurgici sia di aumentare la rigidità del dispositivo, in quanto l'impianto funziona come pilastro stabilizzando il dispositivo e riducendo la sollecitazione meccanica, per l'innesto, durante la masticazione (12).

Le griglie in titanio (GT) sono state inizialmente sviluppate negli anni '60 come dispositivo di contenimento di organi vitali in pazienti traumatizzati nonché, grazie anche alla loro rigidità, con finalità ricostruttiva in pazienti oncologici come dispositivo di ritenzione e immobilizzazione di innesti ossei autogeni particolati, prelevati da siti extraorali.

Negli anni '80 il loro uso è stato esteso a metodiche di aumento dei volumi ossei finalizzati al successivo posizionamento implantare (13).

Nonostante il fatto che la complicazione principale associata all'uso di questo dispositivo sia la sua esposizione in ambiente orale, questo evento non necessariamente compromette il risultato finale (14, 15). Teoricamente l'uso di GT senza fori può dare sia i ben noti vantaggi di contenimento e stabilizzazione dell'innesto sia la capacità di inibizione della crescita competitiva delle tipologie cellulari indesiderate tipico delle membrane. Anche l'impermeabilità e la biocompatibilità devono essere considerati come punti di forza di questo Dispositivo Barriera in Titanio Customizzato (DBTC). Le prime esperienze con i DBTC sono iniziate nel 1998 ma nonostante gli incoraggianti risultati la necessità di sagomarli intra-operatoriamente, per adattarli al sito ricevente, ne ha decretato il progressivo disuso. Recentemente l'avvento delle stampanti 3D ha aperto nuovi orizzonti all'impiego di questi dispositivi (16). Infatti grazie a una delle tante applicazioni della tecnologia CAD/CAM (*Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing*) è stato possibile trasformare i file *Digital Imaging and COmmunications in Medicine* (DICOM), delle indagini tomografiche, in modelli solidi dei mascellari dei pazienti, questo ha reso possibile la premodellazione extraorale dei DBTC con notevole semplificazione e accelerazione delle procedure operatorie intraorali. Studi *in vivo*, utilizzando il *device* in combinazione con un innesto allogenico sia mineralizzato che demineralizzato miscelato con un *carrier* termoplastico, ne validano l'utilizzo, sia da un punto di vista del risultato clinico sia dal punto di vista istologico e istomorfometrico (17-20). Anche con i DBTC è stata riscontrata la scopertura del *device* che poteva essere precoce (entro il primo mese postoperatorio) o tardiva (dopo il primo mese postoperatorio). La frequenza di questi eventi era rispettivamente tra il 20-23,1% e tra il 10-15,4% a seconda degli studi. Sorprendentemente anche nel caso delle scoperture precoci è stata osservata una rigenerazione ossea apparentemente non influenzata da questa complicanza e anzi è stato osservato un incremento nell'ampiezza della banda di gengiva aderente che sovrastava la zona dell'innesto soggetta all'esposizione. Nel caso dell'esposizione precoce i dispositivi sono stati mantenuti in situ per 4 mesi. Dopo la loro rimozione sono stati attesi 2 mesi, per la completa guarigione, per seconda intenzione dei tessuti molli e per la maturazione dell'innesto, prima del posizionamento implantare. Il comportamento descritto sembrerebbe riconducibile a quello descritto da Funakoshi *et al.* nel 2005 con la *Open Barrier Membrane Technique* dove viene volutamente ricercata la mancata copertura della membrana in questo caso in d-PTFE (21).

L'esperienza clinica mostra come l'assenza di fori (caratteristica delle GT) impedisca la crescita del tessuto connettivo e l'infiltrazione del *device*, favorendo sia la rigenerazione ossea che la sua rimozione, nella seconda fase chirurgica. Anche la fase chirurgica risulta notevolmente semplificata e abbreviata. La scopertura del *device*, grazie alla sua impermeabilità e rigidità, non deve essere vista necessariamente come una complicanza sebbene vada precocemente individuata al fine di adottare le appropriate misure volte a preservare il risultato finale.

Questo metodo richiede, al tempo stesso, una costruzione attenta e precisa del dispositivo sul modello stereo litografico e anche le immagini tomografiche devono essere prive di artefatti per non influenzare la fedeltà del modello e quindi del dispositivo che potrebbe non adattarsi

perfettamente su il sito ricevente. Infatti nel caso di *mismatching* tra il dispositivo e il sito ricevente può essere compromesso il risultato finale.

Le attuali conoscenze indicano l'utilizzo di questa procedura nella rigenerazione delle atrofie disto-mandibolari. La tecnica richiede la presenza di piani di appoggio o pilastri ossei per la stabilizzazione del dispositivo.

Inoltre l'uso dei DBTC facilita la sutura dei tessuti molli e la loro guarigione su di essi in virtù anche della loro biocompatibilità.

I risultati suggeriscono buone potenzialità del metodo per l'aumento del volume osseo nelle atrofie disto-mandibolari, incoraggiando ulteriori studi volti alla sua validazione in altri distretti dei mascellari.

Bibliografia

1. Rocchietta I, Fontana F, Simion M. Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008;35:203-15. Suppl. 8.
2. Misch C. *Contemporary Implant Dentistry*. 3rd ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2008. p. 406-18.
3. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;49-70. Suppl. 22.
4. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:672-6.
5. Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1990;1:22-32.
6. Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996 (novembre, dicembre);11(6):735-42.
7. Cucchi A, Ghensi P. Vertical guided bone regeneration using titanium-reinforced d-ptfe membrane and prehydrated corticocancellous bone graft. *Open Dent J* 2014;8:194-200.
8. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration – A materials perspective. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 2012;28:703-21.
9. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res* 2013;57:3-14.
10. Carbonell JM, Martín IS, Santos A, Pujol A, Sanz-Moliner JD, Nart J. High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;43:75-84.
11. Al-Hezaimi K, Rudek I, Al-Hamdan KS, Javed F, Nooh N, Wang H-L. Efficacy of using a dual layer of membrane (d-PTFE placed over collagen) for ridge preservation in fresh extraction sites: a micro-computed tomographic study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2013;24:1152-7.
12. Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995;15(1):10-29.
13. Lawson W, Biller HF. Mandibular reconstruction: bone graft techniques. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1982;90(5):589-94.

14. Her S, Kang T, Fien MJ. Titanium mesh as an alternative to a membrane for ridge augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70(4):803-10.
15. Louis PJ, Gutta R, Said-Al-Naief N, Bartolucci AA. Reconstruction of the maxilla and mandible with particulate bone graft and titanium mesh for implant placement. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(2):235-45.
16. Jacotti M, Wang HL, Fu JH, Zamboni G, Bernardello F. Ridge augmentation with mineralized block allografts: clinical and histological evaluation of 8 cases treated with the 3-dimensional block technique. *Implant Dent* 2012;21(6):444-48.
17. Andreasi Bassi M, Andrisani C, Lopez MA, Gaudio RM, Lombardo L, Lauritano D. Guided bone regeneration in distal mandibular atrophy by means of a preformed titanium foil: a case series. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016;30(2):61-8. Suppl. 1.
18. Andreasi Bassi M, Andrisani C, Lopez MA, Gaudio RM, Lombardo L, Carinci F. Guided bone regeneration by means of a preformed titanium foil: A case of severe atrophy of edentulous posterior mandible. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016;30(2):35-41. Suppl. 1.
19. Andreasi Bassi M, Andrisani C, Lico S, Ormanier Z, Ottria L, Gargari M. Guided Bone Regeneration via a preformed titanium foil: clinical, histological and histomorphometric outcome of a case series. *Oral and iImplantology* 2016;9(4):164-74.
20. Toscano N, Holtzclaw D, Mazor Z, Rosen P, Horowitz R, Toffler M. Horizontal ridge augmentation utilizing a composite graft of demineralized freeze-dried allograft, mineralized cortical cancellous chips, and a biologically degradable thermoplastic carrier combined with a resorbable membrane: a retrospective evaluation of 73 consecutively treated cases from private practices. *J Oral Implantol* 2010;36(6):467-74.
21. Funakoshi E, Kimura H, Nishihara M, Maky K, Yoshida S. Emdogain: the clinical evaluation and future potential roles. *The Quintessence* 2005;24(6):40-60.

RIGENERAZIONE OSSEA GUIDATA CON DISPOSITIVI BARRIERA IN TITANIO CUSTOMIZZABILI ED EVOLUZIONE DEL CONCETTO DI OPEN BARRIER MEMBRANE TECHNIQUE

Mirko Andreasi Bassi

Odontoiatra, libero professionista, Roma

Introduzione

La rigenerazione ossea guidata (*Guided Bone Regeneration, GBR*) è una procedura chirurgica dentale che utilizza dispositivi medici, denominati membrane barriera, per orientare la crescita di nuovo tessuto osseo in siti, dei mascellari, in cui questo è deficitario e altrimenti insufficiente, per una corretta riabilitazione implanto-protetica (1).

L'uso di Membrane di Barriera (MB), per la rigenerazione ossea, è stato descritto per la prima volta nel 1959 in ortopedia (2). I principi teorici fondamentali, per la rigenerazione guidata dei tessuti, sono stati sviluppati da Melcher nel 1976, che ha sottolineato la necessità di escludere le linee cellulari indesiderate dai siti di guarigione per consentire la crescita dei tessuti desiderati (3). Sulla base dei risultati clinici positivi, relativi alla rigenerazione dei tessuti parodontali (osso alveolare, legamento parodontale, cemento radicolare), negli anni '80, la ricerca ha cominciato a concentrarsi sul potenziale per ricostruire i difetti dell'osso alveolare mediante la rigenerazione ossea guidata (4-8).

Gli obiettivi delle MB sono: mantenimento dello spazio; protezione del coagulo; effetto barriera; inibizione del riassorbimento dell'innesto; stabilizzazione dell'innesto (7, 8).

Studi riguardanti la GBR, in comparazione alle altre metodiche di aumento osseo disponibili, sembrano fornire risultati prevedibili e favorevoli, supportati da follow-up a lungo termine, in particolare se eseguite con membrane non-riassorbibili in PoliteTraFluoroEtilene espanso (e-PTFE) rinforzato con un framework di titanio, in modo che l'effetto barriera possa durare fino al secondo intervento chirurgico di rientro, che avviene, di norma, dopo almeno 6 mesi dal primo intervento (9, 10).

Attualmente il materiale da innesto maggiormente utilizzato, in associazione con i dispositivi per la GBR, è rappresentato dall'osso autologo miscelato con uno xenoinnesto (osso bovino deproteinizzato) (1).

Recentemente è stato proposto il PTFE denso (d-PTFE) come membrana non riassorbibile. Questo materiale, nello stesso modo del e-PTFE, può essere vantaggiosamente utilizzato in combinazione con un *framework* di titanio per dare malleabilità e stabilità al dispositivo (11-13). La favorevole affidabilità clinica del d-PTFE ha mostrato che una delle principali caratteristiche insospettite di questa membrana è quella della ridotta permeabilità, tale da inibire la contaminazione batterica dell'innesto, in caso dell'indesiderata esposizione del dispositivo, nel cavo orale, nel periodo postoperatorio (14, 15).

Al fine di realizzare una MB quanto più impermeabile e rigida possibile, sulla scorta di precedenti esperienze con le griglie in titanio, nel 2016 Andreasi Bassi *et al.* hanno proposto l'utilizzo di un Dispositivo Barriera Customizzato In Titanio (DBCT) (16-18).

Le prime esperienze con i DBCT sono iniziate nel 1998 ma nonostante gli incoraggianti risultati la necessità di sagomarli intra-operatoriamente, per adattarli al sito ricevente, ne ha decretato il progressivo disuso.

Recentemente l'avvento delle stampanti 3D ha aperto nuovi orizzonti all'impiego di questi dispositivi (16-18). Infatti grazie a una delle tante applicazioni della tecnologia CAD/CAM (*Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing*) è stato possibile trasformare i file DICOM, delle indagini tomografiche, in modelli solidi dei mascellari dei pazienti, questo ha reso possibile la premodellazione extraorale dei DBCT con notevole semplificazione e accelerazione delle procedure operatorie intraorali. Studi *in vivo*, utilizzando il *device* in combinazione con un innesto allogenico sia mineralizzato che demineralizzato miscelato con un carrier termoplastico, ne validano l'utilizzo, sia da un punto di vista del risultato clinico sia dal punto di vista istologico e istomorfometrico (16-19). Anche con i DBCT, come con le MB in genere, è stata riscontrata la possibile scopertura del *device*, che poteva essere precoce (entro il primo mese postoperatorio) o tardiva (dopo il primo mese postoperatorio). La frequenza di questi eventi, generalmente non associati a una sintomatologia soggettiva da parte del paziente, era rispettivamente tra il 20-23,1% e tra il 10-15,4%, a seconda degli studi (17, 18). Sorprendentemente anche nel caso delle scoperture precoci è stata osservata una rigenerazione ossea, apparentemente non influenzata da questa complicanza, è anzi stato osservato un incremento nell'ampiezza della banda di gengiva aderente, che sovrastava la zona dell'innesto soggetta all'esposizione (Figure 1-5). Nel caso dell'esposizione precoce i dispositivi sono stati mantenuti in situ per 4 mesi. Dopo la loro rimozione sono stati attesi 2 mesi, per la completa guarigione, per seconda intenzione dei tessuti molli e per la maturazione dell'innesto, prima del posizionamento implantare. Il comportamento descritto sembrerebbe riconducibile a quello descritto da Funakoshy et al., nel 2005, con la *Open Barrier Membrane Technique* (OBMP), dove viene volutamente ricercata la mancata copertura della membrana, in questo caso in d-PTFE, nelle procedure di preservazione dell'alveolo post-estrattivo (*socket preservation*) (19).

Già nel 1994, mediante uno studio su animale, Schmid et al. avevano dimostrato l'inutilità della permeabilità della e-PTFE nella GBR, che anzi, in condizioni cliniche, si è dimostrata dannosa per la rigenerazione ossea, nel caso della indesiderata esposizione del *device* (20, 21).

Le attuali esperienze orienteranno pertanto le caratteristiche delle MB non riassorbibili nel prossimo futuro e tra queste la rigidità, la biocompatibilità e l'impermeabilità sembrano essere le più importanti per il successo clinico della GBR.

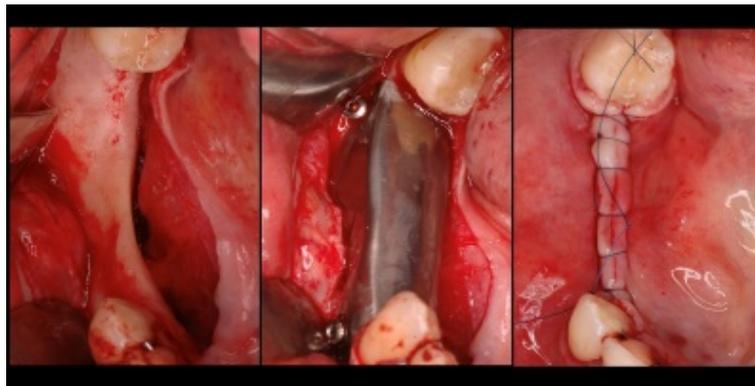
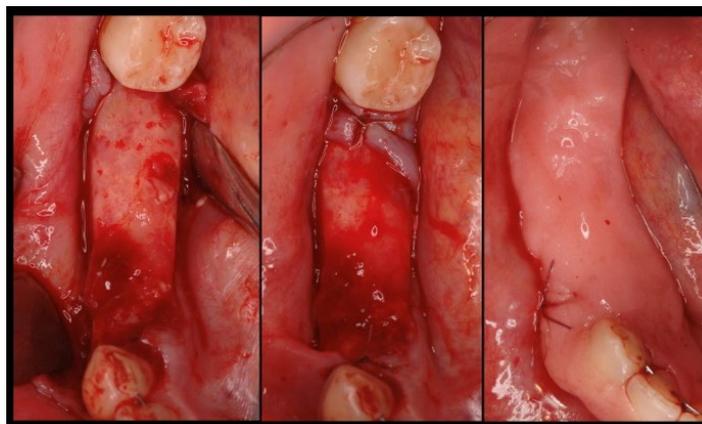


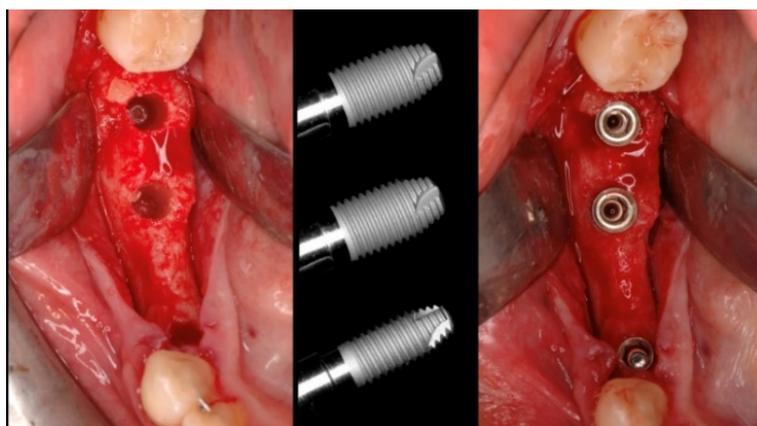
Figura 1. Caso di rigenerazione su mandibola posteriore con dispositivo barriera customizzato in titanio (DBCT) (Foto: Andreasi Bassi M., 2015)



**Figura 2. Esposizione precoce del DBCT e suo controllo nel tempo
(Foto: Andreasi Bassi M., 2015)**



**Figura 3. Rimozione del DBCT dopo 4 mesi, dalla sua applicazione, lasciando guarire la ferita per seconda intenzione e proteggendola con un impacco chirurgico per 7-10 giorni
(Foto: Andreasi Bassi M., 2015)**



**Figura 4. Dopo 2 mesi, dalla rimozione del DBCT, il sito rigenerato viene nuovamente scheletrizzato, per consentire il posizionamento degli impianti
(Foto: Andreasi Bassi M., 2015)**

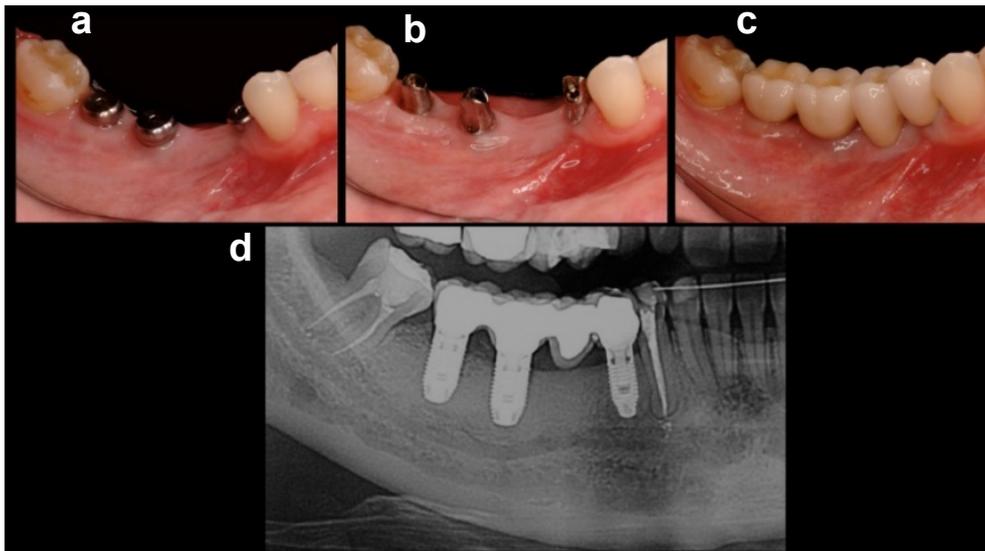


Figura 5. Finalizzazione protesica del caso: a) impianti con viti di guarigione, b) impianti con monconi *in situ*, c) ponte in metallo-ceramica cementato e suo controllo radiografico (d) a 3 anni (Foto: Andreasi Bassi M., 2015)

Conclusioni

I risultati suggeriscono buone potenzialità del *device* per l'aumento del volume osseo nelle atrofie disto-mandibolari, incoraggiando ulteriori studi volti alla validazione del loro utilizzo in altri distretti dei mascellari, nonché allo sviluppo di metodiche rigenerative cui la MB viene volutamente montata esposta all'ambiente orale, al fine di facilitare la gestione intraoperatoria dei tessuti molli da parte del chirurgo e al tempo stesso incrementando la quantità di gengiva aderente.

Bibliografia

1. Rocchietta I, Fontana F, Simion M. Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008;35:203-15. Suppl. 8.
2. Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am* 1959;41A:1243-54.
3. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976;47(5):256-60.
4. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982;9(4):290-6.
5. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11(8):494-503.
6. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* 1986;13(6):604-16.

7. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:672-6.
8. Buser D, Bragger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1990;1:22-32.
9. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;49-70. Suppl. 22.
10. Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996 (novembre, dicembre);11(6):735-42.
11. Cucchi A, Ghensi P. Vertical guided bone regeneration using titanium-reinforced d-ptfe membrane and prehydrated corticocancellous bone graft. *Open Dent J* 2014;14(8):194-200.
12. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration – a materials perspective. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 2012;28:703-21.
13. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res* 2013;57:3-14.
14. Carbonell JM, Martın IS, Santos A, Pujol A, Sanz-Moliner JD, Nart J. High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;43:75-84.
15. Al-Hezaimi K, Rudek I, Al-Hamdan KS, Javed F, Nooh N, Wang H-L. Efficacy of using a dual layer of membrane (d-PTFE placed over collagen) for ridge preservation in fresh extraction sites: a micro-computed tomographic study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2013;24:1152-7.
16. Andreasi Bassi M, Andrisani C, Lopez MA, Gaudio RM, Lombardo L, Lauritano D. Guided bone regeneration in distal mandibular atrophy by means of a preformed titanium foil: a case series. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016;30(2):61-8. Suppl. 1.
17. Andreasi Bassi M, Andrisani C, Lopez MA, Gaudio RM, Lombardo L, Carinci F. Guided bone regeneration by means of a preformed titanium foil: a case of severe atrophy of edentulous posterior mandible. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016;30(2):35-41. Suppl. 1.
18. Andreasi Bassi M, Andrisani C, Lico S, Ormanier Z, Ottria L, Gargari M. Guided bone regeneration via a preformed titanium foil: clinical, histological and histomorphometric outcome of a case series. *Oral and Implantology* 2016;9(4):164-74.
19. Funakoshi E, Kimura H, Nishihara M, Maky K, Yoshida S. Emdogain: the clinical evaluation and future potential roles. *The Quintessence* 2005;24(6):40-60.
20. Schmid J, Hammerle CH, Olah AJ, Lang NP. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(3):125-30.
21. Fontana F, Maschera E, Rocchietta I, Simion M. Clinical classification of complications in guided bone regeneration procedures by means of a nonresorbable membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31(3):265-73.

VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFICACIA DI UN NUOVO COATING PER IMPIANTI ENDO-OSSEI

Francesco Carinci

Dipartimento di Chirurgia Maxillo-facciale, Università di Ferrara

Gli impianti dentali hanno rappresentato una terapia innovativa per il ripristino delle edentulie parziali o totali, anche se, eventi avversi quali infezione e perdita degli impianti possono manifestarsi nel corso degli anni. La perdita degli impianti è principalmente causata dalla peri-implantite, a sua volta correlata alla presenza di placca batterica. Vi sono inoltre altri fattori che possono determinare la perdita degli impianti quali: l'instabilità della protesi, il trauma occlusale, la rigenerazione ossea, la frattura delle componenti protesiche o implantari. La perdita dell'impianto può avvenire poco tempo dopo il suo posizionamento (fallimento precoce o del periodo peri-chirurgico) oppure dopo che l'impianto si è osteointegrato (fallimento ritardato quindi dopo sei mesi dall'inserimento dell'impianto o *fixture*).

Le principali cause del fallimento implantare precoce possono essere: un'inadeguata preparazione del sito implantare, la contaminazione batterica e la mancanza di stabilità primaria.

Il fallimento ritardato è causato principalmente dalla peri-implantite. Analogamente alla malattia parodontale, la peri-implantite è sostenuta dalla placca batterica che attiva la cascata delle citochine e determina un riassorbimento osseo di supporto dell'impianto stesso. Quindi ogni fattore che facilita la formazione di placca batterica (scarsa igiene orale), oppure fattori ambientali quali fumo, concomitante malattia parodontale, o fattori sistemici (es. il diabete) possono contribuire all'insorgenza della peri-implantite.

Nel 2011 il *Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology* (1), ha stabilito che la peri-implantite è sempre causata dalla placca batterica e che vi sono inoltre altri cofattori che favoriscono la perdita dell'impianto come per esempio lo stress biomeccanico, una scorretta cementazione delle componenti protesiche, lo svitamento del moncone (*abutment*) e la frattura dell'impianto.

Secondo queste considerazioni, le più frequenti tipologie di peri-implantiti sono state così classificate:

- peri-implantiti puramente indotte da placca batterica,
- peri-implantiti causate da fattori chirurgici e protesici.

Inoltre una recente revisione sistematica della letteratura (1) ha evidenziato che la peri-implantite rappresenta un'importante entità patologica la cui prevalenza sta aumentando nella popolazione e che presenta una mancanza di standardizzazione dei protocolli terapeutici. La mancanza di protocolli terapeutici efficaci è correlata all'insufficiente comprensione dei meccanismi biologici che stanno alla base di questa patologia (1).

Uno dei siti di proliferazione batterica è la giunzione impianto-moncone (o *fixture-abutment*). Nel 2006 Lazzara e Porter introdussero il concetto di *Platform Switching* (2) che è l'accoppiamento di un *abutment* con un diametro inferiore rispetto al collo dell'impianto. Studi radiologici hanno dimostrato che in queste condizioni vi è una minore perdita di osso peri-implantare (2). Questo fenomeno è stato attribuito a una più grande distanza tra la connessione impianto-*abutment* e l'osso circostante. Una maggiore distanza determina una minore possibilità d'infiltrazione della microflora batterica presente nel micro gap impianto-*abutment* rispetto all'osso peri-implantare.

In ogni impianto è possibile individuare quattro dimensioni definite:

- macro design;
- mini design;
- micro design;
- nano design.

Definiamo macro design la forma dell'impianto stesso che può essere cilindrica, conica, a lama, ecc. Il mini design è rappresentato dalla forma, dalla dimensione e dalla distanza delle spire della superficie dell'impianto. Il micro design è il risultato del trattamento superficiale per "irruvidire" la superficie implantare. Infine il nano design è determinato dalla composizione molecolare della superficie implantare.

Il macro e il mini design conferiscono le proprietà meccaniche dell'impianto, mentre il micro e il nano design le proprietà biologiche.

La possibilità di avere un liquido in grado di legarsi covalentemente alla superficie in titanio della camera interna dell'impianto conferendone proprietà antibatteriche senza modificarne le proprietà meccaniche rappresenta un potenziale grande vantaggio da un punto di vista della produzione industriale. Fino a oggi l'interesse dei ricercatori si è concentrato sul rivestimento delle superfici implantari (*coating* esterno) al fine di potenziare l'osteo-integrazione. La presenza di un *coating* interno all'impianto invece ha la finalità di ridurre la penetrazione e la moltiplicazione batterica all'interno dell'impianto stesso.

Su questa base è stato formulato un nuovo *coating* che consente di legare la clorexidina alla superficie interna dell'impianto (domanda di brevetto PCT/IT2015/000142 depositata il 27/05/2015 dal titolo: *Antimicrobial coating composition for dental implants*).

Nel 3° Convegno Nazionale FORM (3) abbiamo illustrato il problema della connessione degli impianti bifasici quale sede di ritenzione di liquidi salivari e di proliferazione batterica. A oggi la clinica ha dimostrato che il *Platform Switching* può essere uno strumento di ausilio per la prevenzione del riassorbimento osseo intorno all'impianto correlato alla proliferazione batterica. Il nostro gruppo ha ideato una soluzione alternativa e/o complementare rappresentata dal *coating* interno, creando un composto che può essere covalentemente legato alle superfici in titanio fra cui la camera interna implantare, la vite di serraggio e il moncone. Le prove in capsula petri hanno dimostrato l'efficacia del *coating*, rivelando un netto abbattimento del numero delle colonie batteriche. Il dato è stato confermato con la tecnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) effettuata valutando il numero di batteri di *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* (geneticamente modificati tramite introduzione di episoma che conferisce antibiotico-resistenza) capaci di passare dal liquido di coltura in cui sono stati immersi gli impianti (trattati e non) alla camera implantare interna.

I risultati della sperimentazione dimostrano che il *coating* brevettato risulta essere estremamente efficace nel ridurre la carica batterica delle specie parodonto-patogene e riconosciute anche come concausa di peri-implantite.

Bibliografia

1. Lang NP, Berglundh T; Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now? – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011;38(11):178-81.
2. Lazzara RJ, Porter SS. Platform switching: a new concept in implant dentistry for controlling post-restorative crestal bone levels. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26(1):9-17.
3. Carinci F, Bignozzi CA. Rivestimento antimicrobico per impianti bifasici: studio *in vitro*. In: Bedini R, Pecci R, Meleo D e Meli P. *Forum On Regenerative Methods. Metodiche rigenerative: applicazioni innovative in odontostomatologia e ortopedia*. Atti. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016 (ISTISAN Congressi 16/C1). p. 5.

SPERIMENTAZIONE SU MODELLO ANIMALE DI SOSTITUTI OSSEI IN MEDICINA TRASLAZIONALE

Aurelio Muttini

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo

Si può affermare che la sperimentazione su modelli animali sia necessaria nello studio dei sostituti ossei che possono essere dapprima sperimentati poi utilizzati nella pratica in medicina umana. Infatti è evidente che la possibilità di impiegare *in vivo* un sostituto osseo, benché studiato *in vitro*, è necessariamente una ipotesi che deve essere sperimentata su modelli animali per verificarne la ripetibilità. Il modello animale è estremamente importante in quanto è possibile riprodurre sperimentalmente numerose patologie che interessano il paziente umano.

Benché i roditori (conigli, ratti, topi) mantengano, tra gli animali da esperimento, un ruolo importante nello studio dei biomateriali, l'impiego di animali domestici di grossa mole (maiali, pecore) offre indubbi vantaggi in quanto queste specie mostrano un metabolismo basale, dimensioni e durata della vita molto più simili alle caratteristiche umane (1-5). Il modello animale, inoltre, offre la possibilità di eseguire determinazioni importanti nella verifica dei risultati dell'impianto, ad esempio quelle istologiche, immuno-istochimiche di diagnostica per immagini, non su un campione bioptico di piccole dimensioni e non rappresentativo dell'intero innesto, ma bensì su tutto l'impianto. Un sostituto osseo deve necessariamente essere un biomateriale, intendendo per biomateriale l'insieme dei materiali applicati a sistemi biologici e in particolare, materiali bioassorbibili e bioattivi. È noto che un biomateriale deve possedere caratteristiche di osteoinduzione, osteoconduzione e osteointegrazione. Per osteoinduzione si intende il processo per il quale viene indotta l'osteogenesi e implica il reclutamento di cellule immature che vengono stimolate al differenziamento in senso osteogenico (preosteoblasti) (6); il termine osteoconduzione invece indica la crescita dell'osso su di una superficie (6): una buona osteoconduzione è tipica di sostanze biocompatibili; infine per osteointegrazione intendiamo il grado di stabilità dell'ancoramento dell'impianto mediante il contatto diretto osso-impianto (6) ed è di particolare rilievo in implantologia craniofacciale. È noto che dopo il sangue l'osso è il secondo tessuto più trapiantato e che la necessità di ricorrere a un sostituto osseo nasce quando le capacità rigenerative dell'individuo sono insufficienti qualitativamente e quantitativamente o quando è necessaria una maggiore velocità. Le principali applicazioni dei sostituti ossei sono quindi le fratture con gravi perdite di sostanza, le pseudoartrosi, i ritardi di consolidazione, le artrodesi intersomatiche vertebrali e, in chirurgia odontoiatrica, il rialzo del pavimento del seno mascellare. Come già riportato la sperimentazione su modelli animali riveste particolare importanza in questi ambiti. La necessità di ricorrere a un sostituto osseo nasce quando le capacità rigenerative dell'individuo sono insufficienti qualitativamente e quantitativamente o quando è necessaria una maggiore velocità. Un innesto osseo è quindi uno *scaffold*, ovvero una "impalcatura" che dovrebbe guidare, accelerare e sostenere la rigenerazione ossea. Il requisito principale per uno *scaffold* è la biocompatibilità, intesa come mancata produzione di risposte tossiche, pericolose tumorigeniche o immunologiche negli organismi viventi (7). Non devono inoltre essere distrutti dall'infiammazione, devono reagire a una appropriata risposta dell'ospite e devono avere proprietà meccaniche quali la permeabilità, la stabilità, l'elasticità, la flessibilità e l'assorbibilità a una velocità congruente con la sostituzione del tessuto osseo.

Numerosi studi sono stati e vengono effettuati per confrontare le prestazioni dei sostituti ossei "tal quale" con quelle di sostituti ossei sui quali vengono "seminate" cellule staminali. È del tutto

ovvio che tra le cellule staminali più idonee a questo impiego vi sono le cellule staminali mesenchimali ovvero quelle cellule che, sottoposte *in vitro* a stimolazioni idonee, possono differenziare in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico. Tra le varie sorgenti di cellule staminali si segnala la membrana amniotica le cui cellule uniscono a spiccate caratteristiche di staminalità e capacità differenziativa, la completa assenza di complicazioni etiche e di morbilità per il tessuto donatore, essendo la placenta stessa un materiale di scarto (8).

Benché il trapianto osseo sia considerato il miglior metodo nel rialzo del seno mascellare (9) il rischio di trasmissione di malattie con tecniche di allo-xenotrapianto, la limitata disponibilità di materiale e la morbilità per il sito donatore, hanno aumentato la richiesta di sostituti ossei sintetici. Fino a oggi, tuttavia, i sostituti sintetici necessitano di molto tempo per indurre una rigenerazione ossea sufficiente; le medesime considerazioni possono essere fatte per altri impieghi terapeutici degli impianti.

Per quanto concerne il modello animale recenti indagini confermano che la pecora può essere considerata la specie ideale per la sperimentazione di procedure chirurgiche di rialzo del pavimento del seno mascellare (10). Analogamente, anche per quanto concerne la sperimentazione su difetti ossei dello scheletro appendicolare o dei segmenti vertebrali, la specie ovina, per le sue caratteristiche di peso, di carico e di metabolismo osseo, associate agli indubbi vantaggi economici e gestionali rispetto ad altre specie può essere considerata ideale per la sperimentazione dei sostituti ossei.

Bibliografia

1. Wagner JL, Storb R. Preclinical large animal models for hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 1996;3(6):410-15.
2. Bruns J, Kampen J, Kahrs J, Plitz W. Achilles tendon rupture: experimental results on spontaneous repair in a sheep-model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2000;8(6):364-69.
3. Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 2006;39(9):1563-582.
4. McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK, Xian CJ. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2009;219(2):324-33.
5. Parker HG, Shearin AL, Ostrander EA. Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyses in the domestic dog. *Annu Rev Genet* 2010;44:309-36.
6. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001;10:S96-101. Suppl. 2.
7. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2008;15:88-99.
8. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008;26:300-11.
9. Berardinelli P, Valbonetti L, Muttini A, *et al.* Role of amniotic fluid mesenchymal cells engineered onMgHA/collagen-based *scaffold* allotransplanted on an experimental animal study of sinus augmentation. *Clin Oral Investig* 2013;17:1661-675.
10. Valbonetti L, Berardinelli P, Scarano A, Piattelli A, Mattioli M, Barboni B, Vulpiani MP, Muttini A. Translational value of sheep as animal model to study sinus augmentation. *J Craniofac Surg* 2015;26(3):737-40.

SPERIMENTAZIONE CLINICA DI DIVERSE TIPOLOGIE DI SOSTITUTI OSSEI

Deborah Meleo

Odontoiatra, libero professionista, Roma

La rigenerazione del tessuto osseo è stata oggetto, negli ultimi anni, di numerosi studi che hanno condotto alla conoscenza delle caratteristiche chimiche e strutturali di un biomateriale ideale. Poiché, a oggi, l'unico materiale da innesto in grado di svolgere, al contempo, azione di osteogenesi, osteoinduzione e osteoconduzione rimane ancora l'osso autologo, emerge la necessità di superare le problematiche legate alle ridotte quantità disponibili ed alla morbilità associata a un secondo rientro chirurgico nello stesso individuo, utilizzando dei sostituti ossei sia sintetici che biologici. La possibilità di conoscerne a fondo le caratteristiche morfometriche consente di valutare la predicibilità del processo rigenerativo e diverse sono le metodiche finora sfruttate a tal fine (1, 2).

La microtomografia computerizzata a raggi X (micro-CT) è una forma miniaturizzata di tomografia convenzionale, in grado di indagare la struttura interna di piccoli oggetti opachi, fornendone immagini tridimensionali a elevata risoluzione spaziale (minore di 10 µm pixel size). Poiché, ai fini analitici, i campioni esaminati non devono essere alterati o trattati in alcun modo, la tecnica microtomografica risulta essere assolutamente non distruttiva e non invasiva e viene attualmente applicata con risultati proficui sia nello studio dei materiali che in ambito biomedicale. Rispetto alle tradizionali microscopie ottica ed elettronica, che forniscono immagini di tipo bidimensionale, questa innovativa tecnologia di indagine consente di effettuare un'analisi tridimensionale di un campione senza che questo debba essere sottoposto a tagli, coperture o trattamenti chimici particolari. La microtomografia a raggi X soddisfa dunque i requisiti della microscopia 3D ideale: possibilità di indagare un oggetto in condizioni naturali e senza alcun tipo di preparazione o alterazione; capacità di visualizzazione 3D non invasiva, non distruttiva e con un ingrandimento sufficiente; attendibilità della misurazione delle caratteristiche numeriche della struttura interna (morfologia, struttura e ultrastruttura). Da qui l'infinito ventaglio di applicazioni della metodologia in oggetto, non soltanto in campo medico e odontostomatologico, ma nell'ingegneria biomedica, nella scienza dei materiali, nella biologia, nell'elettronica, nella geologia, nell'archeologia, nell'industria petrolifera e dei semiconduttori (3-10).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di confermare le possibilità applicative di tale metodica, attraverso la strumentazione Skyscan 1072, nella caratterizzazione morfometrica del tessuto osseo umano normale e di fornire un ulteriore contributo nella messa a punto della stessa nell'ambito dello studio delle proprietà dell'osso innestato con determinati biomateriali.

In questa indagine sperimentale sono stati indagati sette biomateriali del commercio correntemente utilizzati per la rigenerazione ossea dei mascellari:

- idrossiapatite di origine animale (bovina) Bio-Oss (Geistlich);
- idrossiapatite di origine animale (bovina) Endobon (Biomet);
- idrossiapatite di origine animale (equina) Bio-Gen (Bioteck);
- nanoidrossiapatite di sintesi riassorbibile Apagen 400 Resorb (Stomygen);
- idrossiapatite bioceramica di sintesi ENGIpore (Sweden Martina);
- beta trifosfato calcico (TCP) di sintesi Bioset TCP (Tiradix);
- polimero riassorbibile di sintesi (Acido poli D,L-lattico-glicolico) SINTbone (Ghimas);

Lo studio è stato articolato in due step:

1. preclinico/*in vitro*, durante il quale è stata eseguita una indagine microtomografica dei suddetti biomateriali prima della loro applicazione clinica e in una formulazione volumetrica sufficientemente grande (dimensioni maggiori di 3–4 mm) da consentire delle misurazioni attendibili;
2. clinico/*in vivo*, durante il quale gli stessi biomateriali sono stati impiegati in formulazione più sottile all'interno di difetti ossei elementari (siti post-estrattivi) in pazienti volontari.

Dei tre prodotti presentati, solamente l'Apagen 400 Resorb e l'Endobon, nella prima fase, non sono stati oggetto di studio microtomografico poiché sprovvisti della formulazione dimensionale sufficientemente grande da consentire valutazioni morfometriche pre-impianto attendibili.

Al fine di ottenere delle immagini e dei parametri morfometrici di riferimento, è stato anche eseguito un'analisi microtomografica su un blocchetto di cresta iliaca umana di banca disidratata e deantigenata.

Nella fase preclinica sono stati selezionati alcuni biomateriali osteoconduttori, provenienti dal commercio, e disponibili sul mercato in una formulazione sufficientemente grande, maggiore di 3-4 mm, ed a forma di blocchetto o particolato, in modo da consentire un esame morfometrico microtomografico attendibile. Tale momento è stato considerato preliminare alle applicazioni in un modello umano per verificare attraverso l'indagine microtomografica quanto le caratteristiche morfometriche iniziali di uno *scaffold* possano influire sulla capacità osteoconduttiva dell'innesto.

Dopo l'acquisizione microtomografica, per ogni campione sono state prodotte inizialmente delle immagini bidimensionali e, successivamente, grazie all'impiego di un software specifico (NRecon V1.7; SkyScan), sono state ricostruite le sezioni trasversali. A partire da queste ultime, è stata scelta un'area di interesse (ROI, *Region of Interest*) sulla quale è stato eseguito il processo di binarizzazione o *thresholding*, necessario all'acquisizione dei dati morfometrici e all'elaborazione di immagini 3D.

Tramite il programma CT-Analyser (V1.16.9; SkyScan) è stato possibile ottenere l'analisi dei campioni, mentre tramite il programma *3D_Creator* (V2.5; SkyScan) sono state realizzate le ricostruzioni 3D a partire dalle immagini 2D.

Per ogni campione analizzato sono state prodotte centinaia di slice. Successivamente sono state ottenute immagini tridimensionali (3D). I parametri morfometrici elaborati per la presente indagine sono stati ottenuti grazie al software CT-Analyser. Al termine dell'elaborazione microtomografica *in-vitro* sono state anche ottenute le immagini 3D in negativo per ogni campione allo scopo di visualizzare in maniera più efficace e immediata la rappresentazione dell'interconnettività delle strutture osservate.

I risultati ottenuti in questa fase del lavoro non si pongono lo scopo di identificare il *bioscaffold* migliore, ma debbono essere utilizzati per una migliore conoscenza strutturale dei diversi campioni esaminati e per indirizzare gli operatori del settore verso la scelta del biomateriale più idoneo per una ben identificata applicazione clinica.

È nota l'importanza della struttura tridimensionale di una matrice osteoconduttrice nella formazione di nuovo osso. 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 (13, 14).

La presenza di una matrice osteoconduttrice tridimensionale che abbia delle caratteristiche strutturali più simili possibile al tessuto osseo umano, facilita notevolmente il processo rigenerativo. Un'elevata porosità favorisce l'invasione dell'innesto da parte di cellule progenitrici, quindi 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 (cioè in presenza di tanti e piccoli pori) favoriscono l'adesione cellulare. Al contempo è anche vero che pori di grandi dimensioni e in presenza di ampie interconnessioni tra gli stessi, favoriscono l'osteogenesi permettendo un'adeguata vascolarizzazione e un adeguato trofismo dell'innesto. Una sufficiente porosità e un adeguato valore di "superficie specifica e di separazione trabecolare" consentono e favoriscono l'ingresso e la migrazione all'interno dello *scaffold* di tessuto osseo neoformato. Contemporaneamente, il volume percentuale e lo spessore trabecolare garantiscono al biomateriale delle proprietà meccaniche sovrapponibili a quelle del tessuto osseo umano. I valori ottenuti invece per il fosfato tricalcico e per il biopolimero riassorbibile di sintesi, mostrano che questi biomateriali appaiono come dotati di maggiore pienezza e compattezza rispetto alle controparti e caratterizzati da minor Porosità e inferiore Separazione Trabecolare e conseguentemente minor spazio disponibile per la colonizzazione da parte di cellule osteogenetiche e vasi neoformati. D'altra parte la minor Porosità e il maggior valore di volume percentuale e spessore trabecolare esprimono una maggiore resistenza meccanica (15-32).

Nella fase successiva clinica/*in vivo* tutti e sette i biomateriali inizialmente elencati (a eccezione del campione di spongiosa iliaca umana) sono stati utilizzati in un particolare dimensionalmente inferiore a quello esaminato precedentemente e sono stati impiantati in un modello umano di difetto osseo molto elementare, come un sito post-estrattivo. I prelievi di tessuto osseo rigenerato eseguiti a quattro mesi dal primo tempo chirurgico sono stati sottoposti a esame microtomografico e istologico e confrontati con i risultati di valutazioni analoghe eseguite su campioni prelevati da siti controllo, cioè alveoli post-estrattivi guariti con il solo coagulo ematico nello stesso paziente.

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di confermare le possibilità applicative della metodica microtomografica, nella caratterizzazione morfometrica del tessuto osseo umano normale e di fornire un ulteriore contributo nella messa a punto della stessa nell'ambito dello studio delle proprietà dell'osso innestato con diverse tipologie di biomateriali.

Previa approvazione da parte del comitato etico di riferimento, lo studio è stato condotto su sette pazienti, di età compresa tra i 18 e i 30 anni e in buone condizioni di salute, che necessitavano di estrazione chirurgica bilaterale dei terzi molari inferiori totalmente inclusi. In ciascun paziente il sito post-estrattivo di un lato è stato suturato e fatto guarire semplicemente grazie alla formazione del coagulo (definito sito controllo), mentre l'altro (definito sito test) è stato innestato con uno dei biomateriali osteoconduttori prescelti per questo studio. A sedici settimane dall'evento avulsivo sono stati eseguiti i rientri sia nei siti innestati che non. Sollevato un piccolo lembo muco-periosteale di forma lineare, i prelievi sono stati eseguiti con delle frese *trephine* in acciaio chirurgico e con diametro interno di 3 mm, montate su manipolo contrangolo e sotto abbondante raffreddamento, ottenendo dei campioni di altezza pari a 5 mm circa (carota) che sono stati immediatamente posizionati in formalina e inviati per gli esami microtomografico, istologico e morfometrico.

Al fine di consentire la sovrapposizione dei risultati qualitativi e quantitativi ottenuti, tutti i campioni sono stati scansionati con gli stessi parametri di acquisizione.

Per ciascuna coppia di campioni, carota test e carota controllo, sono stati dunque calcolati i parametri morfometrici e prodotte immagini bi- e tridimensionali con la stessa metodologia adottata nella prima fase (preclinica/*in-vitro*) dell'indagine sperimentale.

Tramite il programma *3D-creator* per l'ottenimento di immagini 3D, queste sono state colorate con lo scopo di poter meglio distinguere all'interno dei tessuti prelevati i diversi stadi di mineralizzazione, nonché per riconoscere ed evidenziare le particelle di biomateriale residuo.

In radiologia è noto che un oggetto viene rappresentato e visualizzato tramite livelli di grigio, i quali corrispondono a un diverso coefficiente d'assorbimento dei raggi X delle strutture che costituiscono il campione stesso (17).

In maniera sperimentale e più comoda per una rappresentazione visiva sono stati scelti tre intervalli di densità a cui sono state assegnate tre diverse colorazioni in modo da poter discriminare all'interno di ciascun campione strutture di diversa radiopacità, quali il tessuto osseo neoformato in diversi stadi di mineralizzazione e i biomateriali utilizzati (33).

Per quanto riguarda le valutazioni di tipo quantitativo deducibili dai dati morfometrici ottenuti, si può affermare che in tutti i casi le carote del lato test hanno dimostrato una minore performance in presenza di un maggior volume di tessuto non mineralizzato, il tutto deducibile da una maggiore porosità, un minore volume percentuale e una maggiore separazione trabecolare rispetto ai campioni controllo. Questo si traduce presumibilmente in una minore o comunque rallentata neoformazione ossea all'interno dei difetti ossei innestati.

Dalle osservazioni delle immagini microtomografiche 3D colorate secondo la metodica definita in precedenza, emergono le seguenti osservazioni di tipo qualitativo, alcune delle quali vanno sostanzialmente a confermare quanto già dedotto dall'analisi dei parametri morfometrici. Nelle ricostruzioni 3D delle carote test è possibile facilmente osservare una maggiore presenza di tessuto non mineralizzato come il connettivo fibroso, le strutture vascolari, gli spazi vuoti. Nelle carote prelevate dopo lo stesso intervallo di tempo dal sito guarito con il solo coagulo ematico si osserva, invece, una più importante formazione di tessuto osseo, con diffuse aree di mineralizzazione. Nei prelievi del lato test sono state osservate delle zone caratterizzate da scarsa componente mineralizzata.

Tutto questo fa ipotizzare un'azione di rallentamento da parte del biomateriale sul processo di neoformazione ossea. È inoltre interessante notare come l'indagine microtomografica consenta di identificare all'interno del tessuto osseo innestato la persistenza di particelle di biomateriale residuo, e questo è maggiormente evidente per uno *scaffold* particolarmente radiopaco come quello di osso equino e per il fosfato tricalcico, mentre è assolutamente non rilevabile per la nanoidrossiapatite riassorbibile, in virtù della sua formulazione in polvere sottile, che non ne consente una nitida visualizzazione e che probabilmente ne favorisce anche un più rapido riassorbimento.

Per quanto riguarda l'analisi istologica, i campioni sono stati successivamente inclusi in resina e trattati secondo le procedure tradizionali per le preparazioni dei tessuti per l'analisi istologica. Nonostante gli indubbi vantaggi della microtomografia a raggi X rispetto alla microscopia ottica tradizionale, solamente l'esame istologico ha potuto confermare la presenza di biomateriale residuo nei campioni ossei del lato test della nanoidrossiapatite riassorbibile e del polimero riassorbibile di sintesi in virtù probabilmente della loro scarsa radiopacità e della loro formulazione in polvere sottile. È da notare, in ultimo, come solamente le immagini istologiche possano discriminare, nell'ambito di quelle zone delle ricostruzioni microtomografiche 3D del campione che rimangono "vuote", la presenza di diverse tipologie di tessuti non calcificati come il tessuto connettivo fibroso, le strutture vascolari, il tessuto adiposo e gli spazi vuoti.

I risultati della presente indagine sperimentale confermano le possibilità applicative della microtomografia a raggi X (34-35) e forniscono un ulteriore contributo nella messa a punto di strategie alternative alle tradizionali microscopie, quali l'ottica e l'elettronica, per la caratterizzazione microstrutturale del tessuto osseo umano normale e rigenerato in seguito all'inserimento di biomateriali osteoconduttori. Sottolineando il fatto che questa innovativa metodologia di indagine consente osservazioni microstrutturali tridimensionali di piccoli oggetti in maniera assolutamente conservativa, tali vantaggi ne estendono notevolmente il campo di utilizzo. In aggiunta, la possibilità di osservazione e di comparazione di *scaffold* utilizzati come sostituti ossei, autorizza il settore biomedicale a erigere la tecnica microtomografica quale ausilio insostituibile nella scelta del sostituto osseo ideale per una data applicazione clinica, e nella ideazione e progettazione di *scaffold* con caratteristiche osteoconduttive ideali e predeterminate, in grado di ovviare in toto al ricorso a innesti di tipo autologo, considerati a oggi il *gold standard*

nella rigenerazione ossea, ma che necessitano di un secondo intervento chirurgico per il loro prelievo causando una maggiore morbilità per i pazienti (29-37).

Bibliografia

1. Chiapasco M, Romeo E. *La riabilitazione implantoprotesica nei casi complessi*. Milano: UTET; 2002.
2. Vacanti CA, Mikos AG. *Tissue engineering*. Larchmont, NY: Mary Ann Liebert Inc.; 1995.
3. 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.
4. 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.
5. van Lenthe HG, 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;28:2479-90.
6. 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.
7. 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):1511-18.
8. Basillais A, Bensamoun S, Chappard C, Brunet-Imbault B, Lemineur G, Ilharberborde 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):141-148.
9. Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, Walder B, Zhang X, Soo C, Ting K, Wu B. Micro-CT 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.
10. 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.
11. Lumelsky NL. Commentary: engineering of tissue healing and regeneration. *Tissue Eng* 2007;13:1393-98.
12. Barbetta A, Bedini R, Pecci R, Dentini M. Role of X-ray microtomography in tissue engineering. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(1):10-8.
13. Freed LE, Guilak F, Guo XE, Gray ML, Tranquillo R, Holmes JW, Radisic M, Sefton MV, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. Advanced tools for tissue engineering: *scaffolds*, bioreactors and signaling. *Tissue Eng* 2006;12:3285-305.
14. Hutmacher DW. *Scaffolds* in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21:2529-543.
15. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial development for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2347-359.
16. Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rügsegger P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998;23(1):59-66
17. Sasov A, Van Dyck D. Desktop X-ray microscopy and microtomography. *J Microsc* 1998;191(2):151-58.

18. Gielkens PF, Schortinghuis 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.
19. Kachelriebe M. Micro-CT. *Handb Exp Pharmacol* 2008;185(1):23-52.
20. 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.
21. 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):156-160. Erratum in: *Clin Oral Implants Res*; 2005.
22. Gielkens PF, Schortinghuis 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.
23. Chappard D, Reatailleau-Gaborit N, Legrand E, Baslè MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and micro-CT. *J Bone Miner Res* 2005;20:1177-84.
24. 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).
25. Bedini R, Ioppolo P, Pecci R, Filippini P, Chiazza 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).
26. Bedini R, Meleo D, Pecci R, Pacifici L. The use of microtomography in bone tissue and biomaterial three-dimensional analysis. *Ann Ist Super Sanità* 2009;45(2):178-84.
27. 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.
28. Kerckhofs G, Schrooten J, van Cleynenbreugel T, Lomov SV, Wevers M. Validation of x-ray microfocus computed tomography as an *imaging* tool for porous structures. *Rev Sci Instrum* 2008;79(1):013711.
29. Bedini R, Meleo D, Pecci R, Pacifici L. The use of microtomography in bone tissue and biomaterial three-dimensional analysis. *Ann Ist Super Sanità* 2009;45(2):178-84.
30. Bedini R, Ioppolo P, Pecci R, Marinozzi F, Bini F, Pepe E, Marinozzi A. *Misura delle caratteristiche di tessuto osseo in condizioni patologiche tramite analisi microtomografica: primi risultati*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 07/07).
31. Lehmann G, Palmero P, Cacciotti I, Pecci R, Campagnolo L, Bedini R, Siracusa G, Bianco A, Camaioni A, Montanaro L. Design, production and biocompatibility of nanostructured porous HAp and Si-HAp ceramics as three-dimensional *scaffolds* for stem cell culture and differentiation. *Ceramics-Silikaty* 2010;54(2):90-6.
32. Bedini R, Marinozzi F, Pecci R, Angeloni L, Zuppante F, Bini F, Marinozzi A. *Analisi microtomografica del tessuto osseo trabecolare: influenza della soglia di binarizzazione sul calcolo dei parametri istomorfometrici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 15/10).
33. Meleo D, Bedini R, Pecci R, Mangione F, Pacifici L. Microtomographic and morphometric characterization of a bioceramic bone substitute in dental implantology. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(1):59-64.
34. Campioni I, Pecci R, Bedini R. Ten years of micro-CT in dentistry and maxillofacial surgery: a literature overview. *Applied Sciences* 2020;10(12):4328.
35. Bedini R, Pecci R, Meleo D, Campioni I. Bone substitutes scaffold in human bone: Comparative evaluation by 3D Micro-CT Technique. *Applied Sciences* 2020;10:3451.

36. Marinozzi F, Marinozzi A, Bini F, Zuppante F, Pecci R, Bedini R. Variability of morphometric parameters of human trabecular tissue from coxo-arthritis and osteoporotic samples. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(1):19-25.
37. Bedini R. A new technology in biomedical engineering analysis: the 3Dimensional microtomography. Preface. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(1):7-9.

RUOLO DELL'OSSO ETEROLOGO CORTICO-SPONGIOSO IN COLTURE DI CELLULE STAMINALI DEL LEGAMENTO PARODONTALE UMANO: UNO STUDIO DI MICROTOMOGRFIA A CONTRASTO DI FASE BASATO SULLA RADIAZIONE DI SINCROTRONE

Alessandra Giuliani

Sezione di Biochimica, Biologia e Fisica, Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Premessa

Poiché la malattia parodontale gioca un ruolo chiave nelle patologie sistemiche e orali, lo studio di interventi clinici terapeutici avanzati per riparare i difetti parodontali è di fondamentale interesse. Questo è stato recentemente effettuato usando costrutti sviluppati *in vitro* che dovrebbero idealmente essere immunologicamente, funzionalmente, strutturalmente e meccanicamente identici al tessuto nativo.

Nella ricerca qui descritta sono state studiate le prime fasi della formazione *in-vitro* di osso su *scaffold* di origine porcina coltivati con cellule del legamento parodontale umano. È stato effettuato un confronto tra il potenziale osteogenico di questa struttura in terreni di coltura basali e differenzianti (in senso osteogenico), al fine di prevedere il suo comportamento biologico come innesto nel difetto osseo umano. Lo studio è stato eseguito anche utilizzando colture *xeno-free*. I risultati sono stati ottenuti tramite microtomografia computerizzata a contrasto di fase (PhC-micro-CT) basata sulla radiazione di sincrotrone.

A partire dalla seconda settimana di coltura (nelle colture *xeno-free fin* dalla prima), sono state rilevate tracce di nuova formazione di osso mineralizzato, sia nei terreni di coltura basali che in quelli differenzianti.

In conclusione, il protocollo sperimentale scelto, basato sull'analisi PhC-micro-CT, ha monitorato con successo e quantitativamente le fasi iniziali della formazione ossea e il tasso di riassorbimento del biomateriale di supporto.

Introduzione

I difetti ossei di grandi dimensioni del sito maxillo-facciale sono attualmente rigenerati mediante innesto di tessuto ricavato da siti diversi dello stesso paziente, tra cui la fibula, la cresta iliaca, la scapola e il radio (1, 2). Queste procedure sono affidabili ed efficaci ma richiedono un ricovero prolungato e un sito donatore in cui potrebbero verificarsi in seguito morbilità secondaria e complicanze associate (3).

L'ingegneria tissutale delle ossa, combinata con la terapia genica e la biologia delle cellule staminali, è considerata un'alternativa promettente all'approccio autologo sopra descritto. D'altra parte, la malattia parodontale gioca un ruolo chiave in una varietà di malattie sistemiche (4-6) e orali che richiedono interventi urgenti e avanzati per la rigenerazione parodontale, tramite utilizzo di cellule staminali (7) e sostituti ossei (8).

Tuttavia, l'affermazione che il costrutto osseo ottimale per la riparazione replicherebbe esattamente la struttura perduta è controversa. Infatti, se questa affermazione è accettata in condizioni standard, casi clinici particolari, come anziani o pazienti con riassorbimento osseo causato da malattia, suggeriscono approcci innovativi (9).

Rapporti recenti hanno dimostrato che molti tessuti adulti contengono una popolazione di cellule staminali (SC) identificate nel tessuto stromale, come midollo osseo, milza e timo. Si tratta di SC postnatali in grado di autorinnovarsi e rigenerare ossa, cartilagine, tendini, muscoli scheletrici, neuroni e tessuti orali (10,11). In particolare, è stata descritta una popolazione di SC trovata nel ligamento periodontale umano (*human Pluripotent Stem Cells*, hPDLSC) e facilmente ottenibili mediante raschiamento delle fibre alveolari crestali e orizzontali. Stanno ricevendo ampia attenzione per il loro immenso potenziale rigenerativo, in quanto presentano un'elevata capacità proliferativa, proprietà immunomodulatorie, potenziale per differenziarsi in linee osteogeniche, adipogeniche e condrogeniche e inoltre possiedono la capacità di generare nuovo tessuto osseo dopo trapianto ectopico (14-16).

Tuttavia, un fattore importante che ostacola tali sforzi è che l'ambiente in cui tali cellule crescono o vengono seminate ha un impatto critico, e in esso risulta scarsamente studiato il loro destino (17-22). Nella scelta di uno *scaffold*, devono essere presi in considerazione una varietà di parametri, come la composizione di fase, la porosità, la dimensione dei pori e l'interconnettività. Questi fattori influenzano il trasporto di sostanze nutritive che consentono la crescita e la proliferazione cellulare e rendono lo *scaffold* idoneo per la crescita del tessuto e, eventualmente, per il differenziamento in senso osteogenico, la formazione del tessuto osseo e la vascolarizzazione (15, 23-25). In questo contesto, è necessario sottolineare che la cinetica delle fasi iniziali della formazione dell'osso in-vitro non è ancora chiara.

I protocolli di routine tipicamente sottopongono i campioni di ingegneria tissutale solo all'analisi istologica e all'esame di microscopia elettronica, per caratterizzare i loro elementi costitutivi in 2D (15,26). La microtomografia a raggi X (micro-CT), una delle più comuni tecniche di *imaging* 3D, è stata più volte applicata per studiare qualitativamente e quantitativamente la crescita del tessuto in diverse condizioni, includendo osso ingegnerizzato (10, 20, 22-25, 27) e tendine (28). Tuttavia, i dati riguardanti l'applicazione di tali tecniche agli stadi iniziali di colture in-vitro di *scaffold* collagenati coltivati con SCs sono ancora limitati.

Inoltre, mentre l'*imaging* a raggi X convenzionale, basato sul contrasto di assorbimento, è poco efficace per studiare i tessuti molli, il contrasto di fase (PhC) è sensibile a elementi leggeri come idrogeno, carbonio, azoto e ossigeno, che si trovano comunemente nei tessuti molli. Il PhC deriva dal fatto che, oltre all'ampiezza, anche la fase risulta modificata quando i fotoni X si propagano attraverso un tessuto. Poiché la probabilità di sfasamento dei raggi X può essere 1000 volte maggiore rispetto all'attenuazione dei raggi X per le energie utilizzate nello studio dei tessuti molli, risulta possibile la visualizzazione in PhC di questi.

Inoltre, poiché il contrasto di fase diminuisce meno rapidamente con l'aumento dell'energia dei raggi X rispetto al contrasto basato sull'attenuazione, il PhC consente la riduzione della dose di radiazioni erogata (29).

In questo studio, abbiamo dimostrato, tramite PhC-micro-CT, il potenziale osteogenico in-vitro di ossa cortico-spongiose di origine porcina coltivate con hPDLSC, anche in terreni di coltura *xeno-free*. Infatti, alcuni degli autori hanno recentemente riportato che le hPDLSC, coltivate in supporti *xeno-free*, costituiscono la base per la *Good Manufacturing Practice* (GMP); infatti esse preservano: (1) le caratteristiche morfologiche e il cariotipo delle cellule staminali; (2) l'espressione di marcatori di staminalità e pluripotenza; e (3) la capacità di differenziare nella linea mesenchimale (11).

Materiali e metodi

Biomateriale

Lo *scaffold*, denominato OsteoBiol® *Dual Block* (DB–TecnoSS® Dental, Coazze, Italia), è un blocco collagenato e demineralizzato costituito da ossa di origine porcina cortico-spongiose. Questo *scaffold* garantisce, grazie alla sua consistenza piuttosto rigida, che il volume originale del sito di innesto rimanga preservato (30-32). Piccoli blocchi di biomateriale, di area di base di circa $20 \times 15 \text{ mm}^2$, sono stati tagliati a fette di spessore di circa 5 mm. Tali fette sono state poi sterilizzate e, successivamente, poste in coltura con le cellule staminali.

Cellule staminali

L'isolamento e la coltura delle cellule staminali del legamento parodontale (hPDLSC) sono state eseguite in accordo con il protocollo descritto in Diomedea *et al.* (31). Brevemente, le biopsie del legamento parodontale sono state ottenute da soggetti umani sani. Le hPDLSC espanse *ex vivo* sono state seminate a quote di 1×10^3 cellule /cm² sulle fette di biomateriale precedentemente descritte. I costrutti così determinati sono stati posti in mezzo idoneo alla coltura di cellule staminali mesenchimali (MSCM, Lonza Verviers Company, Verviers, Belgio), come descritto in Trubiani *et al.* (30). Sono stati considerati quattro diversi tipi di coltura delle hPDLSC su *Dual Block*: nel mezzo MSCM (che chiameremo gruppo DB-ctrl); nel mezzo MSCM integrato con agenti osteogenici (che chiameremo gruppo DB-diff); nel mezzo MSCM e terreno *xeno-free* (che chiameremo gruppo XF-DB-ctrl); nel mezzo MSCM integrato con agenti osteogenici e terreno *xeno-free* (che chiameremo gruppo XF-DB-diff). Sono stati analizzati 3 campioni identici per ciascun gruppo di studio, i primi 2 gruppi a 1, 2 e 3 settimane dall'inizio della coltura, gli ultimi 2 gruppi a 1 e 3 settimane dall'inizio della coltura.

Microtomografia a raggi X

Le analisi di microtomografia sono state eseguite alla linea SYRMEP della sorgente di luce di sincrotrone ELETTRA (Trieste, Italia). I campioni sono stati studiati utilizzando i seguenti parametri sperimentali: voxel isometrico con dimensione di lato pari a 9 μm , energia dei fotoni di 16 keV e distanza tra rilevatore e campione di 150 mm.

Il setting sperimentale si è basato su un approccio fisico di contrasto di fase. In breve, quando un fascio di raggi X attraversa un campione, viene rifratto secondo un indice di rifrazione

$$n(r) = 1 - \delta(r) + i\beta(r)$$

dove δ è il decremento dell'indice e definisce lo sfasamento e β è proporzionale all'indice di attenuazione. Poiché δ è molto più grande della parte immaginaria β in campioni demineralizzati come il DB, il setting a contrasto di fase fornisce una maggiore sensibilità rispetto all'approccio convenzionale basato sull'assorbimento. Dato che δ è proporzionale alla densità elettronica media, che a sua volta è quasi proporzionale alla densità fisica ρ (mg/cm³), da queste analisi è stato possibile monitorare l'evoluzione della mineralizzazione nelle tre settimane di coltura. In questo studio è stato utilizzato il software X-TRACT (CSIRO *Mathematical and Information Sciences*, Canberra, Australia) per ricostruire le sezioni 2D, mediante l'algoritmo di *Phase Retrieval* basato sulla *Transport of Intensity Equation* (TIE) (33, 34) e la successiva applicazione di un algoritmo di *Filtered BackProjection* (FBP).

Il software commerciale VG STUDIO MAX 1.2 (Volume Graphics, Heidelberg, Germania) è stato successivamente utilizzato per la ricostruzione 3D delle immagini e per l'analisi strutturale della porzione trabecolare.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante test one-way ANOVA, utilizzando il software SigmaStat 3.5 (Systat Software, San Jose, USA). Tutti i confronti multipli sono stati eseguiti con il metodo Holm-Sidak, considerando statisticamente significativi i valori $p < 0,05$.

Risultati

Alcuni autori hanno recentemente dimostrato, tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM), qRT-PCR e studi funzionali, che il *Dual Block* posto in coltura con hPDLSC in mezzi *xeno-free* potrebbe guidare il processo di differenziamento in senso osteogenico (31). Tuttavia, il solo studio mediante tecniche di microscopia (come il TEM), spesso fornisce un'analisi quantitativa non completamente affidabile, a motivo del fatto che riduce le informazioni a campioni sostanzialmente bidimensionali (2D). Pertanto, abbiamo convalidato i protocolli di coltura utilizzati da Trubiani *et al.* (31) con i dati quantitativi estratti dall'analisi 3D di microtomografia a contrasto di fase. Infatti, la PhC-micro-CT basata sulla radiazione di sincrotrone si è dimostrata in grado di discriminare con facilità la fase mineralizzata di nuova formazione dallo *scaffold* demineralizzato di origine suina.

L'interazione tra cellule, terreno di coltura e biomateriale ha modificato la densità della struttura in tre settimane dall'inizio della coltura, producendo immagini 3D in cui erano presenti due fasi diverse, la matrice demineralizzata e l'osso in via di mineralizzazione. La PhC-micro-CT ha rivelato che, su terreno *xeno-free*, una quantità significativa (rilevabile) della fase ossea mineralizzata appena formata era presente già dopo la prima settimana in entrambi i terreni, basale che chiameremo "ctrl" e differenziante nominato "diff", e che questa fase si localizzava preferenzialmente nelle aree compatte (32). Questo risultato non coincide con i risultati ottenuti su terreni non *xeno-free* (30), in cui le aree mineralizzate erano rilevabili solo a partire dalla seconda settimana di coltura per entrambi i terreni. Inoltre, su terreni non *xeno-free*, le aree mineralizzate erano principalmente concentrate nella porzione trabecolare.

L'analisi quantitativa della porzione mineralizzata è stata esclusivamente effettuata nelle aree spongiose, contando i voxel sottostanti al picco associato alla specifica fase. I dati ottenuti sono stati espressi come mBV/BV (%) (cioè, come il rapporto tra il volume mineralizzato di nuova formazione (*mineralized Bone Volume*, mBV) e il volume totale dello *scaffold* (BV). Anche lo spessore trabecolare medio e lo spessore medio delle porzioni mineralizzate sono stati valutati nelle stesse aree, ed espresse rispettivamente come BTh (μm) e mBTh (μm).

È interessante notare che, mentre su terreno non *xeno-free* il rapporto mBV/BV risultava in media quasi sette volte maggiore su terreno differenziante (gruppo DB-diff) rispetto al terreno basale (gruppo DB-ctrl) dopo 2 settimane di coltura e 10 volte maggiore dopo 3 settimane di coltura, il confronto tra le colture *xeno-free* in terreno basale (gruppo XF-DBctrl) e in terreno differenziante (gruppo XF-DB-Diff) ha mostrato, nei limiti della ridotta statistica, che nessuna differenza significativa ($p > 0,05$) era presente negli stessi rapporti mBV/BV a tempi di analisi analoghi.

Tuttavia, sono state sempre rilevate differenze molto significative ($p < 0,001$) tra la prima, la seconda e la terza settimana di coltura in entrambi i terreni (ctrl e diff).

Lo stesso comportamento è stato osservato anche nella valutazione dello spessore trabecolare medio, con un incremento di quasi il 50% dello spessore dalla prima alla terza settimana di coltura in entrambi i terreni (*xeno-free* e non). Al contrario, non erano presenti differenze significative ($p > 0,05$) considerando il parametro di spessore osseo mineralizzato medio, né al variare del tempo per lo stesso terreno, né tra colture ctrl e diff a punti temporali identici.

D'altra parte, un'analisi quantitativa basata unicamente sul confronto dei valori morfometrici medi, come quella precedentemente descritta, spesso non risulta completa, richiedendo uno studio più approfondito della distribuzione delle dimensioni dei clusters mineralizzati. Per questo motivo, per studiare più a fondo i cambiamenti nel tempo dell'osso neoformato, è stata valutata anche la distribuzione dello spessore di osso mineralizzato nella porzione trabecolare dei campioni. Si è osservato che, su terreni *xeno-free*, mentre dopo la prima settimana di coltura la distribuzione era bimodale per entrambe le colture ctrl e diff, con nuclei mineralizzati piccoli e medi, rispettivamente di 10-50 μm e 370 μm di spessore, dopo la terza settimana la distribuzione era trimodale per entrambe le colture ctrl e diff, con nuclei mineralizzati piccoli, medi e grandi, rispettivamente di 10-50 μm , 250-290 μm e 550-650 μm di spessore. La presenza, dopo tre settimane, di nuclei di mineralizzazione grandi, con diametro di $\sim 600 \mu\text{m}$, giustifica la valutazione complessiva dello spessore medio dell'osso, con il suo incremento molto significativo dalla prima alla terza settimana in entrambi i terreni di coltura.

Inoltre, è stata valutata anche la densità fisica ρ (mg/cm^3) della fase mineralizzata di nuova formazione. Infatti, grazie all'impostazione sperimentale del contrasto di fase e all'algoritmo TIE implementato per l'analisi dei dati, i livelli di grigio risultano proporzionali al decremento dell'indice di rifrazione δ , che a sua volta è quasi proporzionale alla suddetta densità fisica ρ . Questo dato fisico, spesso definito in letteratura con il termine "*Bone Mineral Density (BMD)*", è risultato essere in aumento dalla prima alla terza settimana, sia su terreno basale (ctrl) che sul differenziante (diff).

È interessante notare che il confronto tra le colture *xeno-free* non ha mostrato alcuna differenza significativa in termini di BMD tra colture ctrl e diff, a istanti temporali identici, con due livelli di mineralizzazione dopo la prima settimana di coltura e un singolo livello dopo tre settimane di coltura.

Discussione

Abbiamo presentato l'uso della micro-CT a contrasto di fase basata sulla radiazione di sincrotrone per studiare, in 3D, la cinetica delle prime fasi del processo di mineralizzazione di *scaffold* demineralizzati cortico-spongiosi in coltura con hPDLSC e seminati su terreni convenzionali e *xeno-free*.

Queste analisi hanno rivelato, già dalla prima settimana di coltura e su entrambi i terreni (ctrl e diff), la presenza di nuclei di mineralizzazione in forma di clusters o fibrille. Lo stesso protocollo sperimentale applicato a costrutti basati su DB non coltivati in mezzi *xeno-free* non ha invece mostrato alcun segnale di mineralizzazione dopo la prima settimana. Si evidenzia quindi un'accelerazione del processo in condizioni *xeno-free*, specialmente nel mezzo basale (ctrl) in cui le cellule dovrebbero impiegare più tempo per differenziarsi rispetto al mezzo osteo-differenziante (diff). Infatti, in uno studio precedente (11) è stato dimostrato che le cellule coltivate in condizioni *xeno-free* mostrano livelli più elevati di mineralizzazione in tempi precoci rispetto alle stesse cellule mantenute in condizioni non *xeno-free*. Noi ipotizziamo che il processo osteogenico potrebbe essere migliorato a motivo della composizione molecolare e chimica del mezzo *xeno-free*.

Per tutti i parametri valutati, all'interno di campioni preparati con dimensioni 3D piuttosto elevate, non erano presenti differenze significative tra colture ctrl e diff a punti temporali identici, ma che un significativo aumento del volume mineralizzato e dello spessore trabecolare medio complessivo sono stati rilevati tra la prima e la terza settimana di coltura su terreno *xeno-free*.

È interessante notare che questi studi hanno confermato pienamente in 3D che non solo il biomateriale non interferisce con la crescita cellulare, ma potrebbe avere un ruolo specifico nell'induzione osteogenica delle hPDLSC, attivando geni tra cui BMP-2/4, RUNX-2 e Collagen1A1.

Inoltre, con questi studi si ha conferma della cinetica di rigenerazione dell'osso ipotizzata precedentemente tramite studi funzionali (31): mentre nella primissima fase (la prima settimana) queste colture erano eterogenee, con la matrice extracellulare a diversi livelli di mineralizzazione, dopo tre settimane di coltura in mezzi *xeno-free* il processo di mineralizzazione appariva quasi completo, almeno dall'analisi dei valori ottenuti per ciò che riguarda la densità fisica dell'osso mineralizzato (BMD-mg/cm³).

Conclusioni

In conclusione, con lo studio precedentemente descritto, abbiamo dimostrato che la PhC-micro-CT su singola distanza, supportata da algoritmi specifici di Phase Retrieval, risulta essere un metodo idoneo a studiare in-vitro le prime fasi della formazione ossea.

Bibliografia

1. Disa JJ, Cordeiro PG. Mandible reconstruction with microvascular surgery. *Semin Surg Oncol* 2000;19:226-34.
2. Emerick KS, Teknos TN. State-of-the-art mandible reconstruction using revascularized free-tissue transfer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:1781-788.
3. Ward BB, Brown SE, Krebsbach PH. Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies. *Oral Dis* 2010;16:709-16.
4. Kiran M, Arpak N, Unsal E *et al.* The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2005;32:266-72.
5. Mealey BL, Rose LF. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Compend Contin Educ Dent* 2008;29:402-13.
6. Manau C, Echeverria A, Agueda A *et al.* Periodontal disease definition may determine the association between periodontitis and pregnancy outcomes. *J Clin Periodontol* 2008;35:385-97.
7. Washio K, Iwata T, Mizutani M *et al.* Assessment of cell sheets derived from human periodontal ligament cells: a preclinical study. *Cell Tissue Res* 2010;341:397-404.
8. Feng F, Akiyama K, Liu Y *et al.* Utility of PDL progenitors for *in vivo* tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis* 2010;16:20-28.
9. Giuliani A, Manescu A, Langer M *et al.* Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line HT revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implication. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:316-324.
10. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88:792–806.

11. Trubiani O, Piattelli A, Gatta V *et al.* Assessment of an efficient *xeno-free* culture system of human periodontal ligament stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2015;21:52-64.
12. Eleuterio E, Trubiani O, Sulpizio M *et al.* Proteome of human stem cells from periodontal ligament and dental pulp. *PLoS ONE* 2013;8:e7101.
13. Trubiani O, Fulle S, Traini T *et al.* Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial. *Eur Cell Mater* 2010;21:72-83.
14. Yang H, Gao LN, An Y *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. *Biomaterials* 2013;34:7033-047.
15. Trubiani O, Orsini G, Zini N *et al.* Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: a morphological report. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(4):986-93.
16. Trubiani O, Zalzal SF, Paganelli R *et al.* Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2010;225:123-31.
17. Giuliani A, Moroncini F, Mazzoni S *et al.* Polyglycolic acid–polylactic acid scaffold response to different progenitor cell *in vitro* cultures: a demonstrative and comparative X-ray synchrotron radiation phase-contrast microtomography study. *Tissue Eng Part C Methods* 2014;20:308-16.
18. Gomes ME, Bossano CM, Johnston CM *et al.* *In vitro* localization of bone growth factors in constructs of biodegradable scaffolds seeded with marrow stromal cells and cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Eng* 2006;12:177-88.
19. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B* 2009;15:113-25.
20. Giuliani A, Fiori F, Manescu A *et al.* Synchrotron radiation and nanotechnology for stem cell research. In: Gholamrezanezhad A ed. Synchrotron radiation and nanotechnology for stem cell research. *Stem cells in clinic and research*. Rijeka, Croatia: InTech, 2011;683-708.
21. Moon SU, Kim J, Bokara KK *et al.* Carbon nanotubes impregnated with subventricular zone neural progenitor cells promotes recovery from stroke. *Int J Nanomedicine* 2012;7:2751-765.
22. Belicchi M, Cancedda R, Cedola A *et al.* Some applications of nanotechnologies in stem cells research. *Mater Sci Eng, B* 2009;165:139-147.
23. Cancedda R, Cedola A, Giuliani A *et al.* Bulk and interface investigations of *scaffolds* and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction. *Biomaterials* 2007;28:2505-524.
24. Renghini C, Giuliani A, Mazzoni S *et al.* Microstructural characterization and *in vitro* bioactivity of porous glass-ceramic scaffolds for bone regeneration by synchrotron radiation X-ray microtomography. *J Eur Ceram Soc* 2013;33:1553-565.
25. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003;22:81-91.
26. Ohgushi H, Tamai S, Dohi Y *et al.* *In vitro* bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 1996;32:333-40.
27. Giuliani A, Manescu A, Larsson E *et al.* *In vivo* regenerative properties of coralline-derived (Biocoral) scaffold grafts in human maxillary defects: demonstrative and comparative study with beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate by synchrotron radiation X-ray microtomography. *Clin Implant Dent Relat Res* 2014;16:736-50.
28. Gigante A, Busilacchi A, Lonzi B *et al.* Purified collagen I oriented membrane for tendon repair: an *ex vivo* morphological study. *J Orthop Res* 2013;31:738-45.

29. Arfelli F, Assante M, Bonvicini V *et al.* Low-dose phase contrast X-ray medical imaging. *Phys Med Biol* 1998;43:2845-852.
30. Manescu A, Giuliani A, Mohammadi S *et al.* Osteogenic potential of dual-blocks cultured with periodontal ligament stem cells: *in vitro* and synchrotron microtomography study. *J Periodontal Res* 2016;51:112–24.
31. Diomedea F, Zini N, Gatta V, *et al.* Human periodontal ligament stem cells cultured onto cortico-cancellous *scaffold* drive bone regenerative process. *Eur Cells Mater* 2016;32:181-201.
32. Mazzoni S, Mohammadi S, Tromba G, *et al.* Role of cortico-cancellous heterologous bone in human periodontal ligament stem cell *xeno-free* culture studied by Synchrotron radiation phasecontrast microtomography. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18(2):364.
33. Gureyev TE, Pogany A, Paganin DM, Wilkins SW. Linear algorithms for phase retrieval in the Fresnel region. *Opt Commun* 2004;231:53-70.
34. Gureyev TE, Mayo SC, Myers DE *et al.* Refracting Rontgen's rays: propagationbased x-ray phase contrast for biomedical imaging. *J Appl Phys* 2009;105:102005.

PIANIFICAZIONE 3D NEGLI INTERVENTI DI CHIRURGIA RIGENERATIVA: VANTAGGI CLINICI ED ERGONOMICI

Michele Lopez
Odontoiatra, libero professionista, Roma

Introduzione

L'odontoiatria odierna si avvale della chirurgia computer guidata e computer pianificata al fine di programmare interventi chirurgici sempre più precisi e meno aggressivi.

L'utilizzo della tecnologia elettronica legata alla pianificazione tridimensionale di un intervento permette di valutare precocemente la posizione dei futuri impianti, la loro inclinazione corretta, le limitanti anatomiche da rispettare e di programmare, al di sopra di essi, una protesi adeguata.

L'utilizzo della chirurgia computer guidata viene effettuata soprattutto per pianificare delle protesi avvitate su impianti al fine di posizionare gli stessi in maniera tale da avere immediatamente una protesi bilanciata.

Obiettivo

Obiettivo del lavoro è valutare l'efficacia della progettazione di un intervento chirurgico di rigenerazione ossea attraverso la modellazione di lamine di corticale eterologa al fine di ridurre i tempi operativi e aumentare la precisione di realizzazione usando gli stessi sistemi con i quali è possibile pianificare una implanto-protesi per progettare degli interventi chirurgici (1, 2).

Materiali e metodi

In questo lavoro, dopo aver sottoposto il paziente a una tomografia computerizzata a fascio conico (*Cone Beam Computed Tomography*, CBCT), si ottengono dei files in formato *dicom* necessari alla costruzione di una visione tridimensionale della parte analizzata e conseguentemente è possibile realizzare dei modelli tridimensionali in resina in scala 1:1 che consentono di visualizzare il distretto anatomico da operare prima dell'intervento chirurgico a livello osseo (3,4).

Su un modello tridimensionale è stata progettata e modellata, attraverso un foglio di carta di una busta termo-plastica utilizzata per sterilizzare gli strumenti, una dima chirurgica che simulasse una lamina eterologa suina al fine di creare una forma tridimensionale. Il settore che andava rigenerato era quello di punta primo quadrante nel quale mancavano gli elementi 14, 15, 16 dove bisognava posizionare due impianti, di cui il primo in posizione 14 e il secondo in posizione 16. Sul 14 vi era un difetto orizzontale per cui era possibile posizionare un impianto del diametro di 3,8 mm e della lunghezza di 12 mm ma bisognava aumentare la cresta di due millimetri orizzontalmente; mentre sul sito del 16 era necessario posizionare un impianto del

diametro di 4,5 mm per la lunghezza di 8 mm ma, essendo la cresta residua di 4 mm era necessaria una rigenerazione verticale.

Il foglio di carta è stato sagomato in maniera tale da permettere il posizionamento vestibolare dello stesso lasciando un gap vestibolo-palatale sul settore mesiale. Il difetto del 16 necessitava di una copertura completa dello spazio riguardante il sito tale da ottenere un aumento verticale.

Il foglio di carta sagomato è stato quindi sterilizzato e al momento dell'intervento è stato possibile ricoprire una lamina corticale eterologa di origine suina dello spessore di 1 mm, ritagliarla seguendo la linea del foglio di carta sterile.

In questa maniera è stato possibile ottenere una lamina perfettamente sagomata e immediatamente posizionabile sul sito da rigenerare in tempi estremamente rapidi evitando possibili contaminazioni del biomateriale stesso e degli impianti posizionati (5, 6).

È stato possibile fissare la lamina di corticale eterologa con un Pin apicale e successivamente riempire lo spazio lasciato tra la lamina e l'osso con della cortico-spongiosa di origine suina micronizzata in matrice collagenosica.

Dopo sei mesi si è avuto un cambiamento del profilo mucoso e, radiograficamente, un addensamento osseo sufficiente a supportare il carico protesico.

Risultati e conclusioni

Questa procedura clinica pianificata permette una riduzione dei tempi chirurgici, una pianificazione perfetta dell'intervento e allo stesso tempo permette una riduzione della contaminazione dei biomateriali e degli impianti utilizzati.

È auspicabile che con la riduzione dei costi di produzione dei modelli tridimensionali e dei software di pianificazione questa procedura possa essere sempre più largamente utilizzata.

Bibliografia

1. Lopez MA, Manzulli N, Casale M, Ormianer Z, Carinci F. The use of resorbable heterologous cortical lamina as a new sinus lift floor: a technical note. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2016;30(2):75-9. Suppl. 1.
2. Lopez MA, Andreasi Bassi M, Confalone L, Carinci F, Ormianer Z, Lauritano D. The use of resorbable cortical lamina and micronized collagenated bone in the regeneration of atrophic crestal ridges: a surgical technique. case series. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2016;30(2) Suppl 1):81-5. Suppl. 1.
3. Lopez MA, Lico S, Casale M, Ormanier Z, Carinci F. The use of various biomaterials in computer-guided crestal sinus lift procedures. A report on two case studies with volume comparison. *Oral Implantol*, 2016;9(2):89-97.
4. Andreasi Bassi M, Lopez MA, Andrisani C, Ormanier Z, Gargari M. Full arch rehabilitation in severe maxillary atrophy with palatal approach implant placement: A case report. *Oral Implantol*, 2016;9(3):115-22.
5. Lopez MA, Andreasi Bassi M, Confalone L, Silvestre F, Arcuri C. The treatment of peri-implant diseases: A new approach using hybenx® as a decontaminant for implant surface and oral tissues. *Oral implantol*, 2016;9(3):106-14.
6. Lopez MA, Andreasi Bassi M, Confalone L, Carinci F. Regeneration of atrophic crestal ridges with resorbable lamina: technical note. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2015;29(3):97-100. Suppl. 1.

TECNOLOGIE INNOVATIVE AL SERVIZIO DELLA SEMPLIFICAZIONE DELLE RIABILITAZIONI IMPLANTOPROTESICHE: IMPLANTOLOGIA COMPUTER-ASSISTITA

Deborah Meleo

Odontoiatra, libero professionista, Roma

L'implantologia moderna si prefigge il compito di migliorare tecniche e materiali a disposizione dell'odontoiatra per rendere gli interventi di riabilitazione implanto-protesica sempre più predicibili. Semplificare e velocizzare gli approcci chirurgici nonché i processi di guarigione dei tessuti è oggi possibile anche grazie al contributo di strumenti di navigazione virtuale con i quali è possibile interagire dinamicamente con il modello 3D del paziente e simulare il risultato della chirurgia.

Le nuove tecnologie digitali hanno notevolmente arricchito i moderni protocolli di trattamento odontoiatrico. L'introduzione di nuovi scanner con tecnologia *Cone Beam* in sostituzione delle vecchie tomografie con fascio spirale ha consentito a chirurghi orali e maxillofacciali di ottenere informazioni più chiare e dinamiche dei volumi ossei mascellari acquisiti, grazie anche all'utilizzo di software molto più performanti. La fase diagnostica può essere poi trasferita nella pratica clinica attraverso l'utilizzo di guide chirurgiche che consentono l'inserimento dell'impianto nella posizione progettata sul paziente virtuale.

I pazienti possono ora beneficiare di protesi dentarie realizzate su misura e in tempo reale, progettate e fabbricate direttamente al computer partendo da un'impronta del cavo orale eventualmente anch'essa digitalizzata.

Gli strumenti digitali (software di programmazione e diagnosi, radiologica 3D, scanner intra e extraorali) diventano importanti mezzi di comunicazione fra medico e paziente. L'informazione circola maggiormente, più rapidamente e in modo più concreto. Le tecniche di chirurgia implantare diventano più veloci, più sicure e meno invasive grazie alla semplificazione dei trattamenti guidati da radiologica 3D, software dedicati e guida chirurgica di precisione. Appaiono evidenti i numerosi vantaggi offerti dall'applicazione di questo innovativo protocollo riabilitativo:

- riduzione dell'invasività degli interventi e dunque miglior decorso postoperatorio grazie soprattutto alla possibilità di realizzare una chirurgia senza lembi (*flapless*).
- riduzione dei tempi operatori e dunque migliore gestione in poltrona di pazienti fobici e a rischio medico sistemico.
- possibilità di intervenire in tutta sicurezza in prossimità di strutture anatomiche nobili preventivamente visualizzate e isolate sul software di programmazione.
- corretto inserimento di tre o più impianti su lunghe zone edentule o intere arcate.
- riabilitazione dei mascellari totalmente edentuli con protesi fisse a carico immediato realizzate preliminarmente all'intervento sulla scorta della progettazione virtuale.

In questa sede verrà discusso uno dei protocolli attualmente disponibili in implantologia computer assistita (*RealGuide*, 3Diemme) attraverso la risoluzione di un caso clinico complesso: una riabilitazione implanto-supportata e con protesi fisse a carico immediato di due arcate totalmente edentule.

La paziente, fobica, di circa 60 anni e in buono stato di salute sistemica, si è presentata all'osservazione con entrambi le arcate totalmente edentule, di recente bonificata per una grave forma di parodontite generalizzata e riabilitata con due protesi totali rimovibili provvisorie assolutamente incongrue sia dal punto di vista estetico sia funzionale. Sono state realizzate delle nuove protesi totali, cosiddette "da scansione", sulla scorta delle quali è stata confezionata una dima radiologica con un reperi radiografico di colore rosso chiamato 3D Marker. I file DICOM (*Digital Imaging and COmmunications in Medicine*) della indagine radiografica CBCT (*Cone Beam Computed Tomography*) eseguita con la dima e i file STL (*STereoLithography*) derivanti dalla scansione extraorale dei modelli di studio delle arcate edentule della paziente sono stati importati nel software per la programmazione virtuale, il *3Diagnosys*, ed è stato sviluppato il progetto della riabilitazione implantoprotesica, scegliendo dimensioni, inclinazione e posizione degli impianti, angolazione dei monconi protesici, morfologia delle protesi per il carico immediato. Preliminarmente all'intervento sono state dunque confezionate le due dime chirurgiche con i pin di fissaggio per la chirurgia guidata e i due circolari provvisori. L'atto chirurgico è stato minimamente invasivo ed evaso in tempi rapidi in poltrona grazie alle guide chirurgiche e allo strumentario dedicato per la chirurgia guidata. La paziente ha ricevuto nella stessa giornata la riabilitazione fissa immediata. Trascorsi circa 6 mesi, è stato eseguito un controllo radiografico preliminare che ha dimostrato il successo dell'osteointegrazione e si è dunque avviata la finalizzazione protesica del caso. Una verifica radiografica a 4 anni ha confermato la bontà nel lungo termine della riabilitazione eseguita.

La digitalizzazione del mondo dentale avanza inesorabilmente e questa sinergia offre numerosi vantaggi. L'odontoiatria digitale è la rivoluzione che sta vivendo il nostro settore ormai già da qualche anno, cambiando radicalmente la pratica clinica odontoiatrica e offrendo risorse in grado di garantire maggiore efficienza e ottimizzazione dei tempi di trattamento con incredibili opportunità sia per il paziente sia per gli operatori del settore. Progettazione e fabbricazione assistita da computer, presa d'impronta digitale, radiologia 3D, chirurgia guidata, sono tutti elementi utilizzati ormai quotidianamente negli studi odontoiatrici e nei laboratori odontotecnici.

FOTOBIOCODULAZIONE IN ODONTOIATRIA E MEDICINA

Morena Petrini

Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università G. d'Annunzio, Chieti

Per *Light Emitting Diode* (LED) si intende la "luce emessa dai diodi". I diodi sono circuiti semiconduttori complessi che convertono la corrente elettrica in luce incoerente a spettro ristretto. In particolare, il diodo è caratterizzato da un anodo e un catodo separati da un cristallo di materiale semiconduttore, in cui l'aggiunta di impurità al materiale semiconduttore produce giunzioni P-N all'interno del chip.

Quando viene applicata una tensione attraverso gli elettrodi, la corrente fluisce dall'anodo (lato P) al catodo (lato N). Quando un elettrone incontra un buco nella giunzione P-N, cade in uno stato di energia inferiore (1). La differenza di energia dei due stati è chiamata "band gap" che è una caratteristica del materiale comprendente la giunzione P-N. L'energia in eccesso dell'elettrone viene emessa come un fotone. Più è il "gap di banda" maggiore è la differenza di energia e più corta è la lunghezza d'onda della luce emessa.

Il termine Fotobiomodulazione (*Photobiomodulation Therapy*, PBM) comprende sia la *Low Level Laser Therapy* (LLLT) ma anche irraggiamenti effettuati con altri dispositivi, per esempio i LED (2). La luce impiegata durante questi trattamenti è rossa o vicino all'infrarosso (*Near-Infrared Rays*, NIR), con lunghezza d'onda compresa tra i 600-1100 nm, *power output* di 1-10.000 mW e una densità di potenza talmente bassa che non riscalda i tessuti (1 W/cm², a seconda della lunghezza d'onda e del tipo di tessuto) (3).

La ricerca scientifica nel PBM è iniziata alla fine degli anni '60 utilizzando i laser appena inventati (1960) e la terapia divenne rapidamente nota come LLLT. Essa era principalmente usata per promuovere la guarigione delle ferite, riduzione il dolore e l'infiammazione. Nonostante fossero disponibili altre fonti di luce durante i primi 40 anni di ricerca sulla PBM, i laser sono rimasti di gran lunga i dispositivi più comunemente impiegati e, di fatto, alcuni autori hanno insistito sul fatto che i laser fossero essenziali per il beneficio terapeutico (2). Il laser, acronimo di luce amplificata e stimolata, è caratterizzato dalla collimazione, coerenza, dalla monocromaticità e a contrario dei LED può emettere luce con possibilità di densità di potenza elevate. Tuttavia negli ultimi anni, fonti di luce non coerenti come i LED si sono ampiamente diffusi. I vantaggi dei LED rispetto ai laser includono maggior sicurezza di utilizzo, facilità d'uso domestico, capacità di irradiare contemporaneamente una vasta area di tessuto, possibilità di predisporre più LED nello stesso manipolo, produzione di dispositivi LED indossabili e costi per mW molto più bassi (2).

Durante la PBM, la selezione dei parametri appropriati come la lunghezza d'onda, la fluenza, la densità di potenza, la struttura dell'impulso e il tempo di applicazione sono fondamentali al fine di evitare un esito meno efficace (o addirittura negativo) della terapia. Infatti, è stata frequentemente osservata una dose-risposta bifasica in cui bassi livelli di luce hanno una migliore capacità di stimolare e riparare i tessuti rispetto a quelli più alti.

Diversi studi hanno dimostrato la capacità della fotobiomodulazione di accelerare la guarigione delle ferite, diminuirne l'infiammazione, stimolare l'attività linfatica, ridurre lo spasmo muscolare, favorire il ringiovanimento e la rigenerazione dei tessuti nervosi, tuttavia, negli ultimi anni anche un effetto antibatterico è stato descritto. In uno studio, *in vivo*, pubblicato nel 2013, abbiamo verificato che l'utilizzo della PBM, a quei tempi ancora indicata con il termine

LLLT, dopo l'estrazione chirurgica dei terzi molari inclusi, era in grado di ridurre il *discomfort* postoperatorio (4). In particolare, sia al primo che al settimo giorno dopo l'intervento, il gruppo trattato era caratterizzato da un incremento dell'apertura interincisale, una riduzione del trisma, dell'edema e del dolore, rispetto al gruppo non irraggiato.

In un altro studio retrospettivo, abbiamo verificato che i pazienti che erano stati irraggiati anche prima dell'intervento, avevano consumato un quantitativo di antiinfiammatori significativamente inferiore, rispetto agli altri gruppi (5).

Le applicazioni della PBM in ambito medico e odontoiatrico sono molteplici, vanno dal trattamento di patologie infiammatorie muscolari (6), alla ri-perfusione di tessuti infartuati (7), dai trattamenti anti-age (7) a quelli che favoriscono la ricrescita dei capelli (8). Recenti studi hanno evidenziato importanti benefit in ambito neurologico della PBM nel ridurre la sintomatologia di deficit cognitivi e di memoria in pazienti affetti da patologie quali la demenza o il Morbo di Alzheimer's (3, 9).

L'economicità dei dispositivi LED, la loro facilità di utilizzo e la sicurezza di utilizzo, hanno portato le aziende a produrre dei dispositivi da utilizzare a casa (10).

Nella PBM un fotone deve essere assorbito da uno specifico cromoforo molecolare per avere un effetto biologico (3). I cromofori possono essere molecole endogene già presenti nell'organismo, oppure sostanze esogene, applicate dall'esterno, come avviene nella terapia fotodinamica.

I cromofori che sono stati postulati per essere utili nel PBM, assorbono a diverse regioni di lunghezza d'onda dello spettro elettromagnetico (blu, verde, rosso, NIR). Tra i cromofori endogeni, il più noto è il Citocromo C Ossidasi (CCO), che è l'enzima terminale (unità IV) nella catena di trasporto degli elettroni situata nella membrana mitocondriale esterna.

PBM, sembra promuovere un aumento della disponibilità di elettroni per la riduzione dell'ossigeno molecolare nel centro catalitico del CCO, aumentando il potenziale della membrana mitocondriale (*Mitochondrial Membrane Potential* – MMP) e aumentando i livelli di ATP (*Adenosin Tri-Fosfato*), adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e specie reattive dell'ossigeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), favorendo un incremento della funzione mitocondriale e innescando l'avvio di vie di segnalazione cellulare (11).

La produzione di ROS sembra essere anche alla base dell'effetto antibatterico promosso dalla PBM.

In diversi studi *in vitro* abbiamo verificato come l'utilizzo di irraggiamento NIR, era in grado di promuovere una significativa riduzione sia di *Enterococcus faecalis* (12), un batterio particolarmente noto in odontoiatria per causare lesioni endodontiche recidivanti, che *Pseudomonas aeruginosa* (13), causa di molte infezioni nosocomiali.

Inoltre, l'effetto antibatterico sembrava essere mantenuto nel tempo (14).

I benefici della PBM in odontoiatria vanno, quindi, dall'effetto anti-infiammatorio, analgesico, rigenerativo e antimicrobico. Tuttavia, al fine di ottenere il risultato terapeutico, è fondamentale, rispettare precisi parametri dipendenti non solo dal dispositivo utilizzato ma anche dal paziente e nello specifico dal tessuto da irraggiare.

Bibliografia

1. Lee ML, Wang SS, Yeh YH, Liao PH, Sheu JK. Light-emitting diodes with surface gallium nitride p-n homojunction structure formed by selective area regrowth. *Sci Rep* 2019;9(1):3243.
2. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasers vs light emitting diodes? *Photochem Photobiol Sci* 2018;17(8):1003-017.
3. Hamblin MR. Photobiomodulation for Alzheimer's disease: Has the light dawned? *Photonics* 2019;6(3):77.

4. Ferrante M, Petrini M, Trentini P, Perfetti G, Spoto G. Effect of low-level laser therapy after extraction of impacted lower third molars. *Lasers Med Sci* 2013;28(3):845-9.
5. Petrini M, Ferrante M, Trentini P, Perfetti G, Spoto G. Effect of pre-operative low-level laser therapy on pain, swelling, and trismus associated with third-molar surgery. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2017; 22(4):e467-e72.
6. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* 2017;4:337-61.
7. Liebert A, Krause A, Goonetilleke N, Bicknell B, Kiat H. A Role for photobiomodulation in the prevention of myocardial ischemic reperfusion injury: a systematic review and potential molecular mechanisms. *Sci Rep* 2017;7:42386.
8. Lanzafame RJ, Blanche RR, Bodian AB, Chiacchierini RP, Fernandez-Obregon A, Kazmirek ER. The growth of human scalp hair mediated by visible red light laser and LED sources in males. *Lasers Surg Med* 2013;45:487-95.
9. Lim L, Loheswaran G, Zomorodi R, Saltmarche A, Chao L. Photobiomodulation: a novel approach to treating Alzheimer's disease. *Photobiomodulation in the Brain*. Elsevier;2019,401-17.
10. Hamblin MR. Photobiomodulation for the management of alopecia: Mechanisms of action, patient selection and perspectives. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2019;12:669-78.
11. De Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2016;22(3).
12. D'Ercole S, Spoto G, Trentini P, Tripodi D, Petrini M. *In vitro* inactivation of *Enterococcus faecalis* with a led device. *J Photochem Photobiol B Biol* 2016;160:172-7.
13. Petrini M, Trentini P, Tripodi D, Spoto G, D'Ercole S. *In vitro* antimicrobial activity of LED irradiation on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Photochem Photobiol B Biol* 2017;168:25-9.
14. Petrini M, Spoto G, Scarano A, D'Arcangelo C, Tripodi D, Di Fermo P, *et al*. Near-infrared LEDS provide persistent and increasing protection against *E. faecalis*. *J Photochem Photobiol B* 2019;197:111527.

SEZIONE 4
Biomateriali, rigenerazione tissutale
e tecnologie innovative in ortopedia

SOSTITUZIONE DEL TESSUTO OSSEO: DALLA RICERCA DI BASE ALLA PRATICA CLINICA

Giandomenico Logroscino

*Istituto di Clinica Ortopedica e Traumatologia, Università Cattolica del Sacro Cuore-Fondazione
Policlinico Gemelli, Roma*

Introduzione

La sostituzione del tessuto osseo è necessaria in numerose discipline mediche quali la chirurgia ortopedica, quella maxillo facciale, plastica, neurochirurgica e oncologica.

In traumatologia, per esempio, in seguito a traumi a elevata energia, la perdita di sostanza può raggiungere dimensioni ragguardevoli (diversi centimetri), tali da rendere improbabile una guarigione spontanea. Lo stesso problema si presenta in chirurgia vertebrale, per la necessità di ottenere ampie artrodesi multisegmentarie, o per la sostituzione di interi corpi vertebrali, o in chirurgia protesica di revisione di anca e di ginocchio per la necessità di sostituire ampie perdite di sostanza. Anche nel trattamento delle pseudoartrosi, fratture non guarite e non guaribili spontaneamente o nel caso delle osteomieliti, processi infettivi dell'osso, la perdita ossea è spesso tale da rendere difficile la guarigione in assenza di innesti ossei.

Il trattamento delle perdite ossee è stato sino a ora sostanzialmente di due tipi:

- sostituzione con componenti artificiali;
- trattamento biologico.

Nel primo caso (soprattutto in campo protesico) si è assistito allo sviluppo di impianti da revisione di maggiori dimensioni o sostitutivi di interi segmenti ossei (materiali in leghe metalliche), ma anche maggiormente invasivi, e destinati a loro volta nel tempo a usura e quindi a fallimento.

Riguardo il trattamento biologico un'ampia varietà di sostituti ossei è stata impiegata negli ultimi 50 anni. Il sostituto osseo ideale dovrebbe avere diverse proprietà:

- essere biocompatibile e non evocare alcuna risposta infiammatoria avversa;
- essere facilmente adattabile e applicabile sul difetto osseo;
- essere osteoconduttivo o osteoinduttivo e riassorbibile;
- essere facilmente conservabile e avere un costo ragionevole.

I sostituti ossei possono essere così classificati:

- innesti ossei (autotrapianto, allotrapianto, xenotrapianto),
- sostituti sintetici ceramici (idrossiapatite, tricalciofosfato, solfato di calcio),
- sostituti biologici,
- fattori di crescita: il plasma ricco di piastrine (PRP, *Platelet Rich Plasma*), la matrice ossea demineralizzata (DBM, *Demineralized Bone Matrix*) e infine le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP, *Bone Morphogenetic Proteins*).

Più di recente le moderne tecniche di *Tissue Engineering* hanno permesso l'utilizzo di cellule (staminali o mesenchimali) modificate geneticamente associate in biocompositi.

Innesti ossei

Il trattamento chirurgico nella ricostruzione dei difetti ossei dell'apparato scheletrico, causati da varie condizioni patologiche (traumatiche, tumorali, mobilizzazioni protesiche, ecc.), si giova frequentemente dell'impiego di trapianti ossei autologhi ed eterologhi. La richiesta di sostituti di osso è in continuo aumento mentre la disponibilità di donatori si dimostra insufficiente al fabbisogno mondiale. Sono peraltro note le problematiche relative all'uso degli innesti di tessuto osseo; i limiti nell'utilizzo degli autotrapianti sono legati alla morbilità del sito donatore, alla quantità limitata dell'innesto e al riassorbimento precoce (1), mentre per gli allotrapianti le problematiche da affrontare riguardano la risposta immunitaria e i rischi legati alla trasmissione di malattie (2). Pertanto si stanno studiando differenti alternative in grado di stimolare quei processi biologici necessari per ottenere una neo-apposizione ossea adeguata.

Sostituti ossei sintetici e nanotecnologie

In alternativa si sono utilizzati biomateriali a base di idrossiapatite (*HydroxyApatite*, HA) o fosfato tricalcico (*TriCalcium Phosphate*, TCP) che, a imitazione fisico-chimica della componente minerale dell'osso sono più o meno riassorbibili, osteoconduttivi e spesso scarsamente resistenti ma trovano applicazione con il presupposto di sostituire temporaneamente il segmento mancante e quindi essere a loro volta riassorbiti, mettendo a disposizione (passivamente) dell'organismo ioni calcio e fosforo favorevoli alla neo-osteogenesi. L'HA è un cristallo relativamente inerte e non riassorbibile, mentre il TCP più poroso e in genere subisce una biodegradazione entro 6 settimane dal suo impianto. L'HA raggiunge una resistenza meccanica molto elevata, mentre il TCP ha scarse qualità meccaniche. Generalmente la base è un fosfato di calcio bifasico, che combina il 40-60% di TCP con il 60-40% di HA, compromesso tra la resistenza meccanica e riassorbibilità.

Di grande interesse è l'approccio reso possibile dalle nuove nanotecnologie. In particolare ove la nanotecnologia fornisca i mezzi tecnici atti a riprodurre quanto in biologia avviene spontaneamente, si ha la realizzazione della "nanobiotechnology", che si giova dell'esempio di modelli viventi pre-esistenti per la realizzazione di sistemi artificiali "biologicamente ispirati", "autoassemblanti" e soprattutto dotati di proprietà biologiche finora impensabili e intelligenti.

In campo biomedico le prospettive sono molteplici e accattivanti e spaziano dalla realizzazione di nuovi strumenti diagnostici miniaturizzati a sistemi di somministrazione di farmaci e a nuove generazioni di tecniche di ingegneria tissutale. Anche il campo dei biomateriali prevede futuristiche prospettive. Dalla realizzazione di sistemi di superficie di rivestimento bioselettivi, a biomateriali sostitutivi dotati di specifiche proprietà superficiali in grado di modificare il proprio comportamento in relazione all'ambiente biologico all'interno del quale sono impiantate (bioattività, dismissione di farmaci, chemioterapici o fattori di crescita, tamponamento del PH) e quindi in un certo senso di funzioni variabili in grado di reagire all'ambiente esterno in modo "intelligente" e interattivo.

Un ulteriore progresso potrebbe essere costituito dalla realizzazione di una nuova famiglia di biosostituti ossei a base di HA realizzati con tecnologia miniaturizzata a livello nanometrico mediante auto-assemblamento al fine di ottenere un materiale in HA con una conformazione fisica molto più simile al tessuto osseo naturale. Questo meccanismo di autoaggregazione non si discosta molto dal normale processo osteogenetico che avviene nell'organismo umano. Un approccio di questo tipo può essere realizzato partendo dall'unione dei due costituenti fondamentali dell'osso: HA e collagene per ottenere un HA/Col nucleata tramite il diretto autoassemblaggio spontaneo sul *network* collagenico precostituito, molto più simile al tessuto

osseo. L'obiettivo sarebbe quello di realizzare un sostituto dell'osso nanostrutturato prodotto mediante un approccio "biomimetico" con la premessa che i sistemi biologici producano informazioni a livello molecolare.

Fattori di crescita

Più di recente si è assistito all'utilizzo di sostanze biologicamente attive, di natura proteica, capaci di stimolare in maniera attiva la crescita ossea (osteoinduttori). Di qui l'introduzione nel mercato di una gamma di prodotti, definiti più o meno impropriamente "fattori crescita" tra i quali il PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) o PRP (*Platelet Rich Plasma*), le DBM (*Demineralized Bone Matrix*) e infine le BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*); queste ultime sono le uniche dotate di comprovata efficacia sull'uomo. Di natura proteica, agiscono con meccanismo recettoriale a stimolare la chemiotassi, la differenziazione in senso osteogenico e la produzione di osso da parte di cellule osteogeniche loro precursori. L'azione è quindi limitata nel tempo e dose dipendente. Di queste solo la BMP-2 e BMP-7 sono state approvate e commercializzate per l'utilizzo nell'uomo.

Terapia genica e cellule staminali mesenchimali

La terapia genica in ortopedia e traumatologia ha avuto un notevole sviluppo nell'ultima decade, prospettando notevoli potenzialità di applicazione clinica nel trattamento di condizioni patologiche, quali le pseudoartrosi, i ritardi di consolidazione e le lesioni cartilaginee (3). La terapia genica può rappresentare una valida opzione terapeutica per stimolare la formazione ossea, dal momento che con questa tecnica uno specifico fattore osteogenico può essere rilasciato in uno specifico sito anatomico e indurre la produzione di proteine deputate all'osteogenesi. Uno dei possibili approcci clinici della terapia genica è quello *ex-vivo*, che si basa sul prelievo di una linea cellulare autologa che viene "modificata" con un fattore di crescita osteogenico e poi reimpiantata nel sito anatomico dove è richiesta la neoformazione ossea. A tal fine sono state spesso utilizzate con risultati molto incoraggianti linee cellulari multipotenti, come le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo, modificate poi *ex-vivo* per l'espressione di vari fattori osteogenici appartenenti alla famiglia delle BMPs (4-5). Molte altre linee cellulari e tecniche di transduzione genica sono state testate e comparate per l'applicazione *ex-vivo*, ed è stato dimostrato che differenti tipi cellulari sono ugualmente utilizzabili e che i costrutti adenovirali difettivi rappresentano i vettori più appropriati ed efficienti per trasportare il fattore di crescita all'interno.

Gli approcci basati sulle cellule si basano principalmente su cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cell*, MSC), che sono state ampiamente impiegate, in combinazione con appropriati *scaffold* osteoinduttivi/conduktiviti (9,10). Le MSC sono cellule staminali multipotenti capaci di un ampio potenziale di differenziazione in senso mesenchimale. Le MSC si trovano nel midollo osseo e in altri organi o tessuti (grasso, muscoli, pelle, membrana sinoviale, tendini, ecc.) (11). I vantaggi delle MSC risiedono nella possibilità di isolamento e di espansione *ex-vivo*, preservando la loro plasticità e il potenziale di auto-rinnovamento. Su appropriata induzione *in vitro*, le MSC possono essere differenziate in senso osteogenico. È interessante notare che le MSC indifferenziate sono inclini all'influenza dell'ambiente, il che significa che possono subire una differenziazione osteogenica spontanea con inoculazione *in vivo* nel tessuto osseo (12). Questa caratteristica ne permette l'utilizzo sicuro in quanto non implica alcun tipo di induzione osteogenica *ex vivo* prima dell'inoculazione *in vivo*. Tuttavia, la produzione di MSC per uso clinico richiede strutture a prova di GMP (*Good Manufacturing Practice*) per la loro

amplificazione di coltura su larga scala *ex vivo*, in modo da ottenere la quantità necessaria per l'innesto osseo. Inoltre la loro presenza è diversa da soggetto a soggetto e varia notevolmente con l'età.

Conclusioni

La perdita ossea continua a rappresentare una sfida importante in chirurgia. Nonostante i progressi tecnologici, gli innesti ossei naturali continuano a essere i sostituti ossei più efficaci per sostituire le perdite ossee. Le alternative agli innesti ossei mancano di uno o più elementi (cellule osteogeniche e resistenza meccanica, fattori di crescita, osteoinduttività o osteoconduttività), che sono un prerequisito per la guarigione dell'osso. Inoltre la maggior parte dei sostituti ossei sono costosi o richiedono tecniche laboriose e spesso non sono validati dalla Medicina basata sulle evidenze (*Evidence Based Medicine*, EBM) e pertanto non sono raccomandabili per l'uso clinico. I sostituti ossei ceramici sono la migliore alternativa agli innesti ossei, per sicurezza, efficacia e costi. BMP-2 e BMP-7 sono certificati EBM, per uso specifico, ma con costi elevati. Le tecniche di Tissue Engineering, di terapia genica e di cellule staminali mesenchimali sono promettenti, ma ancora lontane dalla diffusione clinica su larga scala.

Bibliografia

1. Damien JC, Parson JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991;2(3):187-208.
2. Binderman I, Fin N. Bone substitutes organic, inorganic, and polymeric: Cell material interaction. In: Yamamuro T, Hench L, Wilson J (Ed.). *CRC Handbook of Bioactive Ceramics*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1990. p. 45-51.
3. Lattanzi W, Pola E, Pecorini G, Logroscino CA, Robbins PD. Gene therapy for *in vivo* bone formation: recent advances. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005;9(3):167-74.
4. Moutsatsos IK, Turgeman G, Zhou S, Kurkalli BG, Pelled G, Tzur L, Kelley P, Stumm N, Mi S, Muller R, Zilberman Y, Gazit D. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther* 2001;3(4):449-61.
5. Blum JS, Barry MA, Mikos AG. Bone regeneration through transplantation of genetically modified cells. *Clin Plast Surg* 2003;30(4):611-20.
6. Sugiyama O, Orimo H, Suzuki S, Yamashita K, Ito H, Shimada T. Bone formation following transplantation of genetically modified primary bone marrow stromal cells. *J Orthop Res* 2003;21(4):630-7.
7. Gugala Z, Olmsted-Davis EA, Gannon FH, Lindsey RW, Davis AR. Osteoinduction by *ex vivo* adenovirus-mediated BMP2 delivery is independent of cell type. *Gene Ther* 2003;10(16):1289-96.
8. Shen HC, Peng H, Usas A, Gearhart B, Cummins J, Fu FH, Huard J. *Ex vivo* gene therapy-induced endochondral bone formation: comparison of muscle-derived stem cells and different subpopulations of primary muscle-derived cells. *Bone* 2004;34(6):982-92.
9. Gomez-Barrena E, Rosset P, Muller I, Giordano R, Bunu C, Layrolle P, Kontinen YT, Luyten FP. Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1266-86.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-147.

11. Barba M, Pirozzi F, Saulnier N, Vitali T, Natale M Teresa, Logroscino G, Robbins P D, Gambotto A, Neri G, Michetti F, Pola E, Lattanzi W (2012). Lim mineralization protein 3 induces the osteogenic differentiation of human amniotic fluid stromal cells through Kruppel-like factor-4 down-regulation and further bone-specific gene expression. *J Biomed Biotechnol* 2012;813894.
12. Barba M, Cicione C, Bernardini C, Michetti F, Lattanzi W. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art. *Biomed Res Int* 2013;416391.

RIGENERAZIONE DEL DISCO INTERVERTEBRALE MEDIATA DALLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Gianluca Vadalà, Vincenzo Denaro

UOC di Ortopedia e Traumatologia, Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Roma

Introduzione

La lombalgia è uno dei sintomi più disabilitanti e comuni tra la popolazione adulta nei paesi industrializzati. La prima causa di tale condizione clinica è la degenerazione del disco intervertebrale, processo caratterizzato da una progressiva riduzione del contenuto dei proteoglicani nel Nucleo Polposi, responsabile della disidratazione del disco e della perdita delle sue proprietà morfofunzionali e biomeccaniche.

A oggi, il trattamento della lombalgia è basato su approcci conservativi e invasivi che, tuttavia, non sono in grado di ripristinare le caratteristiche fisiologiche del disco, ma riescono solo a supportare la riduzione della sintomatologia algica e/o rallentare la degenerazione. In più, queste opzioni sono caratterizzate da comorbidità, costi e rischi secondari non trascurabili.

Il potenziale utilizzo di differenti tipi di cellule stromali/mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) per il trattamento della degenerazione del disco intervertebrale si è rivelato molto promettente in esperimenti *in vitro* e *in vivo*. La combinazione di differenti citotipi, condizioni culturali precondizionanti, *scaffold* ingegnerizzati e sistemi di somministrazione hanno portato alla ricostituzione della matrice discale, a un aumento della vitalità cellulare e alla rigenerazione tissutale in diverse condizioni sperimentali. Questo articolo ha l'obiettivo di passare in rassegna la letteratura attuale sulla terapia per la degenerazione del disco basata sull'utilizzo di cellule staminali e sui risultati che i diversi approcci hanno prodotto.

La lombalgia colpisce più dell'80% della popolazione generale almeno una volta nella vita, causando elevata morbidità con gravi implicazioni economiche, sociali e psicologiche. La lombalgia si attesta come la prima causa di disabilità in individui con età inferiore ai 45 anni, specialmente di sesso femminile, provocando delle importanti perdite economiche nei Paesi sviluppati (1).

La principale causa della lombalgia è la degenerazione del disco intervertebrale. Questo è costituito da tre tessuti altamente specializzati: il Nucleo Polposi (NP), l'Anello Fibroso (AF) e i piatti vertebrali, che connettono il disco ai corpi vertebrali adiacenti. L'AF è un anello fibrocartilagineo, composto da lamelle di fibre collagene di tipo I dense, concentriche e altamente orientate, le quali costituiscono una matrice organizzata ospitante cellule simil-fibroblastiche. Il NP è formato da una matrice amorfa, gelatinosa, ricca in proteoglicani (principalmente aggregano) e collagene di tipo II. L'aggregano, un proteoglicano di grandi dimensioni in grado di interagire con l'acido ialuronico, è composto da numerosi GlicosAminoGlicani (GAG) solforati carichi negativamente (condroitin solfato e cheratan solfato) capaci di legarsi a molecole di acqua. L'elevato livello di idratazione conferisce al NP una pressione di rigonfiamento che è responsabile del mantenimento dell'altezza dello spazio discale, oltre a conferire al disco stesso resistenza meccanica a torsione, flessione e compressione. Nel NP sono localizzate piccole cellule simil-condrocitiche, responsabili della sintesi dei proteoglicani per il mantenimento del microambiente della matrice (2).

La degenerazione del disco intervertebrale è un processo cronico dipendente principalmente dall'età, caratterizzato da una progressiva riduzione del contenuto dei proteoglicani (e

conseguentemente del grado di idratazione) nel NP, con la successiva incapacità, da parte del disco, di far fronte a forze compressive causando instabilità (3).

La degenerazione discale può evolvere verso diversi disordini vertebrali, tra cui l'erniazione del disco, la spondilolistesi degenerativa e stenosi del canale vertebrale con associati sintomi neurologici, tra cui radicolopatia e mielopatia. Le attuali opzioni per il trattamento della lombalgia e della degenerazione discale spaziano da approcci conservativi, come il riposo, la terapia analgesica e antinfiammatoria e la fisioterapia, fino ad approcci invasivi, tra cui infiltrazioni epidurali di steroidi, tecniche ablativo e chirurgiche, come la discectomia, la sostituzione totale del disco, la laminectomia e la fusione vertebrale (4).

Tuttavia, queste opzioni hanno dimostrato efficacia limitata e non consentono di ottenere risultati affidabili e prevedibili. Infatti, esse agiscono attenuando i sintomi e non mirano al meccanismo fisiopatologico della degenerazione discale. Per questo motivo, si avverte un bisogno emergente di individuare un trattamento precoce per la lombalgia che possa prevenire, rallentare, arrestare o finanche invertire il processo degenerativo.

I significativi avanzamenti nei campi della terapia con cellule staminali hanno consentito di sviluppare protocolli rigenerativi innovativi mirati a interferire con la storia naturale della degenerazione discale, mirando alla riparazione/rigenerazione del disco e al recupero funzionale. Lo scopo di questo articolo è discutere l'uso potenziale di cellule staminali stromali/mesenchimali (MSC) derivate dal midollo osseo per la rigenerazione del disco intervertebrale.

Fisiopatologia della degenerazione del disco intervertebrale

L'eziologia e la fisiopatologia dettagliate della degenerazione del disco intervertebrale rimangono ancora poco chiare. Tuttavia, è noto che la progressiva riduzione di aggregato e acqua libera nel NP è responsabile delle principali alterazioni strutturali coinvolte nel processo degenerativo (2). Ciò sembra disturbare il normale equilibrio tra le funzioni anaboliche e cataboliche delle cellule del NP, causando ridotta sintesi, aumentato turnover o una combinazione di questi due processi nella matrice del NP (5).

In più, il progressivo calo del numero e della densità delle cellule residenti nel NP è stato associato sia con l'invecchiamento che con la degenerazione discale. È stato ipotizzato che questo comprometta la capacità del disco di compensare queste alterazioni producendo e mantenendo una matrice extracellulare funzionale (6).

La conseguenza diretta della riduzione del contenuto dei proteoglicani nel NP è la disidratazione, che provoca la riduzione dell'altezza degli spazi discali e la capacità del disco di sopportare carichi meccanici (7). La distribuzione anomala delle forze meccaniche attraverso il disco degenerato provoca traumi e microlacerazioni dell'AF, erniazione discale e alterazioni patologiche dei corpi vertebrali tra cui sclerosi subcondrale, ossificazione dell'*end-plate* e osteofitosi. La collocazione anatomica relativamente isolata, l'avascolarità e la bassa attività metabolica del disco intervertebrale potrebbero essere le ragioni principali per l'apparente incapacità del disco di auto-rigenerarsi di fronte al danno e alla degenerazione (1).

Terapia basata su cellule staminali

Recuperare la capacità del disco di ricostituire la matrice e ristabilire il contenuto originale dei proteoglicani potrebbe aumentare l'idratazione dello stesso e al miglioramento delle sue proprietà

biomeccaniche (1). La progressiva perdita di cellule che caratterizza la degenerazione e l'invecchiamento del disco intervertebrale potrebbe essere limitata iniettando cellule esogene con lo scopo di supplementare e ricostituire la popolazione originale del disco stesso. Questo approccio terapeutico basato sull'utilizzo di cellule è stato indagato usando differenti tipi cellulari, tra cui cellule del disco (8) e cellule progenitrici (9).

Il trapianto di condrociti autologhi del disco è attualmente sotto valutazione clinica come possibile approccio per prevenire le sequele degenerative dopo chirurgia lombare. A oggi, questo metodo ha dimostrato di essere sicuro e di diminuire il grado di lombalgia, di ridurre l'assottigliamento del disco e di ricostituire parzialmente l'ambiente fisiologico del NP (10). Tuttavia, questo approccio è attuabile solo dopo la realizzazione di una discectomia ed è limitata da bassi livelli di espansione e dalla perdita delle caratteristiche fenotipiche delle cellule quando espanso in una coltura cellulare in *monolayer*. Uno studio recente ha dimostrato che quest'ultima limitazione potrebbe essere superata coltivando le cellule autologhe del NP insieme a cellule staminali mesenchimali provenienti dal midollo osseo. Questo processo consente di ottenere cellule del NP attivate che hanno dimostrato l'abilità di aumentare la sintesi di collagene di tipo II e dei proteoglicani e di ripristinare l'altezza dello spazio discale (11).

D'altra parte, la terapia a base di cellule staminali è caratterizzata da bassa morbilità al sito di prelievo (problema importante in chirurgia vertebrale), semplicità di espansione *ex vivo* e modulazione favorevole del fenotipo prima o dopo il trapianto.

Le cellule staminali sono definite come cellule indifferenziate caratterizzate da elevato potenziale proliferativo, capacità di auto-rinnovamento e differenziamento in multiple linee cellulari (1). Le cellule staminali adulte possono essere prelevate da tessuti completamente differenziati, tra cui midollo osseo, tessuto adiposo, muscolare, cutaneo, periostale, dal sangue, dai vasi, dalle membrane sinoviali e dall'osso trabecolare (12). La loro prima funzione è quella di rimpiazzare cellule preesistenti che siano senescenti e/o danneggiate, seguendo un percorso di differenziamento lungo una specifica linea cellulare, così da garantire e mantenere l'omeostasi fisiologica dei tessuti in cui risiedono. Dato che possono essere isolate direttamente dai tessuti del paziente, l'applicazione delle cellule staminali adulte in medicina rigenerativa non solleva alcuna questione etica.

L'uso potenziale di cellule staminali adulte, come quelle derivate dal midollo osseo (MSC), dal tessuto muscolare (*Muscle-derived Stem Cells*, MdSCs), dal tessuto adiposo (*Adipose Stem Cells*, ASCs), le cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells*, HSCs), le cellule staminali della membrana olfattiva (*Olfactory Stem Cells*, OSCs), le cellule staminali sinoviali e le cellule staminali discali, è stato preso in considerazione per la rigenerazione del disco intervertebrale (12). Tutti questi citotipi hanno dimostrato la capacità di differenziarsi verso linee cellulari di derivazione mesenchimale, tra cui grasso, cartilagine, osso e muscolo. In più, si è dimostrato che tutti questi tipi cellulari originano dalle cellule residenti nella zona perivascolare, come periciti e cellule reticolari avventiziali dei sinusoidi del midollo osseo (12).

Esistono diversi metodi per utilizzare le cellule staminali adulte per la rigenerazione del disco intervertebrale:

- possono essere prelevate, manipolate in sala operatoria e iniettate;
- possono essere isolate ed espanse *ex vivo* e poi trapiantate nel disco come cellule indifferenziate o
- pre-differenziate con l'utilizzo di fattori di crescita o metodi di co-coltura;
- possono essere ingegnerizzate e combinate con idrogels visco-elastici;
- possono essere transfette con geni prescelti e poi iniettate nel disco.
- possono essere anche trapiantate allogenicamente a partire da formulazioni attualmente disponibili in commercio (13).

La somministrazione sistemica di cellule staminali derivate dal midollo osseo è stata testata in un modello animale: anche se non vi è stato un cambiamento significativo nella composizione della matrice cellulare, tale approccio ha dimostrato ridotta reazione all'ipossia, ridotto rischio di erniazione e aumentata sintesi di citochine, condizioni che complessivamente possono favorire il trattamento della degenerazione discale (14).

Effetto terapeutico delle cellule staminali nella rigenerazione del disco

Negli ultimi dieci anni numerosi studi *in vitro* hanno sollevato la possibilità di considerare l'uso di cellule staminali adulte per il trattamento della degenerazione del disco intervertebrale.

Ciò è stato postulato dopo che le cellule staminali mesenchimali umane sono state riconosciute per la loro capacità di differenziarsi in cellule simil-condrocitiche del NP se coltivate in condizioni discogeniche (es. aggiungendo alla coltura fattori di crescita condrogenici e/o co-coltivando le cellule staminali con cellule del NP) (15). Studi di co-coltura hanno dimostrato che un effetto sinergico e un *cross-talk* tra MSC e cellule del NP potrebbero aumentare la sintesi delle proteine della matrice extracellulare del NP e indurre il differenziamento in cellule del NP (15, 16).

Il nostro gruppo ha studiato il meccanismo di interazione tra MSC e cellule del NP prelevate da dischi in degenerazione co-coltivandole in un sistema di coltura tridimensionale caratterizzato da una distanza breve e tale da consentire interazioni di tipo paracrino tra le cellule, caratteristica tipica del NP. I profili di espressione genica sono stati analizzati in entrambi i tipi cellulari e hanno mostrato che le MSC avevano acquisito un fenotipo simil-condrocitico e influenzato i livelli di mRNA (*Messenger Ribonucleic Acid*) nelle cellule umane del NP, provocando un aumento dell'espressione di collagene di tipo II da parte delle cellule del NP, mentre la sintesi dell'aggreco era diminuita (15).

Uno studio recente ha confermato la nostra ipotesi (15) che le cellule del NP da sole e le MSC co-coltivate con cellule del NP mostrano una maggiore espressione di collagene di tipo II e aggreco, così come un aumento del contenuto dei GAG, se confrontate con colture contenenti le sole MSC. Tuttavia, la presenza di condizioni degenerative nel mezzo di coltura hanno aumentato drammaticamente l'espressione dei geni catabolici nei gruppi delle sole cellule del NP, mentre questo effetto dannoso ha avuto solo una leggera influenza nei gruppi in co-coltura, che hanno dimostrato di essere più resistenti all'infiammazione e l'ipossia. Configurare un micropellet invece di coltivare cellule individuali ha dimostrato di ridurre l'espressione di geni catabolici nonostante le condizioni ipossiche e infiammatorie (17)].

Alcuni ricercatori (18) hanno approfondito ulteriormente questa interazione paracrina isolando MSC, cellule dell'AF e del NP dalle vertebre dello stesso donatore e coltivate insieme. Le co-culture erano caratterizzate da aumentati livelli di mRNA dei componenti della matrice (tra cui collagene di tipo II, aggreco e versicano), dei fattori di crescita (EGF, IGF-1, TGF- β etc.) e ridotta espressione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α and IL-6) rispetto alle monoculture (18).

Evidenze di efficacia in modelli preclinici

Il disco intervertebrale è caratterizzato da avascolarità, ipossia, basso pH, iperosmolarità e basso contenuto di glucosio. Tutte queste caratteristiche lo rendono un ambiente ostile che potrebbe esaurire il suo intrinseco potenziale di autoriparazione e antagonizzare l'attecchimento di cellule staminali esogene in seguito al trapianto. La sopravvivenza a lungo termine delle MSC in seguito a iniezione intradiscale è stata riportata da numerosi studi. Tra questi, il nostro gruppo

ha dimostrato la presenza delle MSC nel disco lombare di un coniglio sano dopo 6 mesi dal trapianto (16).

Per valutare il ruolo della terapia a base di cellule staminali per la rigenerazione del disco intervertebrale, è cruciale testare approcci rigenerativi su modelli animali che possano realisticamente simulare la condizione umana. Sakai *et al.* sono stati i primi a dimostrare che le MSC derivate dal midollo osseo disperse in una matrice di collagene di tipo II e iniettate in un modello animale di degenerazione discale (coniglio) hanno portato a un aumento del contenuto di proteoglicani, della idratazione e dell'altezza dello spazio discale, che era rimasta costante dopo sei mesi con valutazione alla risonanza magnetica (9).

Da allora, si sono visti avanzamenti significativi grazie a *trial* controllati su animali basati su terapie con cellule staminali. Una *review* sistematica e una metanalisi hanno dimostrato che 22 studi hanno riportato miglioramenti statisticamente significativi di altezza discale, sintesi di collagene di tipo II e ridotte alterazioni degenerative alla valutazione istologica (19). Questi risultati sono caratterizzati da eterogeneità statistica a causa del diverso tipo di modello animale (piccola taglia vs grande taglia), citotipo (cellule del NP, MSC, ecc.) e mezzo iniettabile (soluzione acquosa vs *scaffold* biocompatibili) (20).

Uno studio recente di Maidhof *et al.* ha dimostrato che non solo il tipo cellulare e il metodo di somministrazione devono essere considerati, ma anche pianificare un *timing* ideale per il trapianto può influenzare i risultati clinici. Gli autori hanno somministrato MSCs a 3, 14 o 30 giorni dopo il danno e poi hanno valutato l'effetto del timing sulla biochimica e la biomeccanica del disco; le cellule iniettate dopo 3 giorni hanno portato a un significativo miglioramento della ritenzione cellulare, delle proprietà biomeccaniche compressive e della ricostituzione della matrice, mentre le cellule somministrate più tardivamente non hanno prodotto risultati comparabili, dimostrando così che la terapia cellulare può essere determinante se attuata a uno stadio precoce della degenerazione (21).

Uno studio preclinico effettuato dal nostro gruppo ha dimostrato un potenziale effetto collaterale della terapia basata su cellule staminali. Il trapianto di MSC in un modello animale di degenerazione discale (coniglio) ha causato la formazione di osteofiti a causa dell'allontanamento delle cellule staminali dal sito di iniezione (22). Per superare il problema del danneggiamento dell'AF e della dispersione delle cellule, il nostro gruppo ha introdotto un nuovo metodo per somministrare le cellule miste a un idrogel nel NP attraverso l'*endplate* lungo un piccolo tunnel che può essere riparato dopo la somministrazione. Questo potrebbe essere un approccio rigenerativo promettente per trattare gli stadi più tardivi della degenerazione discale (23).

Traduzione clinica

Il primo studio clinico di fase I sul trapianto di MSC autologhe derivate dal midollo osseo ed espanse è stato effettuato da Orozco *et al.* su NP di dieci pazienti affetti da degenerazione discale lombare con AF intatto. Dopo 1 anno dall'intervento chirurgico, l'approccio si è rivelato sicuro e ha dimostrato un miglioramento degli indici di dolore e disabilità (24).

Elabd *et al.* hanno dimostrato che le MSC autologhe derivate dal midollo osseo coltivate in condizioni ipossiche e poi iniettate nei dischi di cinque pazienti ha portato a un miglioramento generale della qualità della vita dopo 4-6 anni dall'intervento chirurgico (25).

In un *trial* clinico randomizzato basato sull'utilizzo di MSC allogeneiche, Noriega *et al.* hanno trattato 24 pazienti con lombalgia e diagnosi di degenerazione discale dividendoli in due gruppi. Un gruppo ha ricevuto una iniezione intradiscale di 25×10^6 MSC per segmento, mentre il gruppo di controllo ha ricevuto l'iniezione di una schiuma mista ad anestetico nella muscolatura paravertebrale. Questo studio preliminare di fase II ha dimostrato efficacia clinica in termini di

riduzione significativa del dolore nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo. In più la degenerazione discale, quantificata dalla scala di Pfirrmann, si è rivelata migliorata nei pazienti trattati mentre è peggiorata nei pazienti del gruppo di controllo (13).

Seppur incoraggianti, questi studi hanno incluso un piccolo numero di pazienti.

Conclusioni

Importanti passi in avanti verso la conoscenza e la comprensione della biologia e biochimica del disco intervertebrale, così come della fisiopatologia della sua degenerazione, sono stati fatti negli ultimi anni. La progressiva perdita cellulare che caratterizza l'invecchiamento e la degenerazione del disco, insieme all'apparente incapacità delle cellule del NP di autoriparare il danno intrinseco, hanno sollevato la possibilità di implementare il tessuto nativo con cellule staminali adulte trapiantate. Questo approccio si è mostrato ripetutamente capace di ristabilire il microambiente discale, portando a rigenerazione del tessuto. Tuttavia, sono necessari maggiori sforzi per valutare l'efficacia di una terapia basata su cellule staminali adulte per trattare la degenerazione del disco intervertebrale in *trial* clinici su larga scala. Il trapianto di MSC si è dimostrato promettente e sicuro sia in modelli animali che in *trial* clinici, rendendo questo approccio uno strumento importante per trattare la degenerazione del disco intervertebrale nel prossimo futuro.

Bibliografia

1. Vadala G, Russo F, Di Martino A, Denaro V. Intervertebral disc regeneration: from the degenerative cascade to molecular therapy and tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9(6):679-90.
2. Roughley PJ, Melching LI, Heathfield TF, Pearce RH, Mort JS. The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. *Eur Spine J* 2006;1:S326-32. Suppl. 3.
3. Boni M, Denaro V. *Anatomo-clinical correlations in cervical spondylosis*. In: Kehr P, Weidner A (Ed.). *Cervical Spine I*. Springer: Berlino; 1987. p. 3-20.
4. Vadala G, Russo F, Ambrosio L, Di Martino A, Papalia R, Denaro V. Biotechnologies and biomaterials in spine surgery. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015;29:137-47. Suppl. 4.
5. Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, Kompel JF, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction. *Spine J* 2005;5(1):14-23.
6. Gruber HE, Hanley EN, Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine* 1998;23(7):751-57.
7. Papalia R, Di Pino G, Tecame A, Vadala G, Formica D, Di Martino A, Albo E, Di Lazzaro V, Denaro V. Biomechanical and neural changes evaluation induced by prolonged use of non-stable footwear: a systematic review. *Musculoskelet Surg* 2015;99(3):179-87.
8. Ganey T, Libera J, Moos V, Alasevic O, Fritsch KG, Meisel HJ, Hutton WC. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Spine* 2003;28(23):2609-20.
9. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, Nomura T, Okuma M, Nishimura K, Nakai T, Ando K, Hotta T. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 2003;24(20):3531-41.

10. Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng* 2007;24(1):5-21.
11. Nukaga T, Sakai D, Tanaka M, Hiyama A, Nakai T, Mochida J. Transplantation of activated nucleus pulposus cells after cryopreservation: efficacy study in a canine disc degeneration model. *Eur Cell Mater* 2016;31:95-106.
12. Vadala G, Russo F, Ambrosio L, Loppini M, Denaro V. Stem cells sources for intervertebral disc regeneration. *World J Stem Cells* 2016;8(5):185-201.
13. Noriega DC, Ardura F, Hernandez-Ramajo R, Martin-Ferrero MA, Sanchez-Lite I, Toribio B, Alberca M, Garcia V, Moraleda JM, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: a randomized controlled trial. *Transplantation* 2017;101(8):1945-51.
14. Cunha C, Almeida CR, Almeida MI, Silva AM, Molinos M, Lamas S, Pereira CL, Teixeira GQ, Monteiro AT, Santos SG, Goncalves RM, Barbosa MA. Systemic delivery of bone marrow mesenchymal stem cells for in situ intervertebral disc regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2017;6(3):1029-39.
15. Vadala G, Studer RK, Sowa G, Spiezia F, Iucu C, Denaro V, Gilbertson LG, Kang JD. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33(8):870-6.
16. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2008;8(6):888-96.
17. Ouyang A, Cerchiari AE, Tang X, Liebenberg E, Alliston T, Gartner ZJ, Lotz JC. Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D coculture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells. *J Orthop Res* 2017;35(1):61-73.
18. Shim EK, Lee JS, Kim DE, Kim SK, Jung BJ, Choi EY, Kim CS. Autogenous mesenchymal stem cells from the vertebral body enhance intervertebral disc regeneration by paracrine interaction: an *in vitro* pilot study. *Cell Transplant* 2016;25(10):1819-832.
19. Wang Z, Perez-Terzic CM, Smith J, Mauck WD, Shelerud RA, Maus TP, Yang TH, Murad MH, Gou S, Terry MJ, Dauffenbach JP, Pingree MJ, Eldrige JS, Mohammed K, Benkhadra K, van Wijnen AJ, Qu W. Efficacy of intervertebral disc regeneration with stem cells—a systematic review and meta-analysis of animal controlled trials. *Gene* 2015;564(1):1-8.
20. Oehme D, Goldschlager T, Ghosh P, Rosenfeld JV, Jenkin G. Cell-Based Therapies Used to Treat Lumbar Degenerative Disc Disease: A systematic review of animal studies and human clinical trials. *Stem Cells Int* 2015;2015:946031.
21. Maidhof R, Rafiuddin A, Chowdhury F, Jacobsen T, Chahine NO. Timing of mesenchymal stem cell delivery impacts the fate and therapeutic potential in intervertebral disc repair. *J Orthop Res* 2017;35(1):32-40.
22. Vadala G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;6(5):348-55.
23. Vadala G, Russo F, Pattappa G, Schiuma D, Peroglio M, Benneker LM, Grad S, Alini M, Denaro V. The transpedicular approach as an alternative route for intervertebral disc regeneration. *Spine* 2013;38(6):E319-24.
24. Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation* 2011;92(7):822-8.
25. Elabd C, Centeno CJ, Schultz JR, Lutz G, Ichim T, Silva FJ. Intra-discal injection of autologous, hypoxic cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in five patients with chronic lower back pain: a long-term safety and feasibility study. *J Transl Med* 2016;14:253.

OSSERVAZIONI MICROTOMOGRAFICHE DI RIGENERAZIONE TISSUTALE IN ODONTOIATRIA E IN ORTOPEDIA

Raffaella Pecci

Centro Nazionale Tecnologie Innovative in Sanità Pubblica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La microtomografia assiale computerizzata (micro-CT, *micro-Computed Tomography*) permette di effettuare lo studio di diverse tipologie di campioni fornendo informazioni sulla loro struttura interna senza doverli tagliare e/o trattare chimicamente. La tecnica, ormai nota (1-4), è utilizzata in molti settori, primi fra tutti l'odontoiatria e l'ortopedia, in particolar modo per la valutazione qualitativa e quantitativa di rigenerazione tissutale in difetti ossei mascellari, mandibolari e vertebrali.

La rigenerazione ossea nel seno mascellare è una condizione essenziale per gli impianti dentali nella mascella posteriore atrofica. La limitata disponibilità di autotrapianti e il rischio di trasmissione della malattia da parte di allo e xenotrapianti hanno aumentato l'utilizzo di sostituti ossei sintetici impiegati come *scaffold*, ossia impalcature che favoriscono la proliferazione e l'adesione cellulare fino alla formazione di tessuto nuovo. Ceramiche di fosfato di calcio, come idrossiapatite (*HydroxyApatite*, HA) e tricalcio fosfato (*TriCalcium Phosphate*, TCP), sono considerati entrambi materiali adatti per la ricostruzione ossea poiché coniugano un'alta biocompatibilità con un'efficiente osteoconduttività (5-6). L'architettura porosa e il grado di interconnettività sono ulteriori fattori critici per determinare il successo clinico dei biomateriali (7-8). In effetti, la composizione chimica e l'architettura dei biomateriali è fondamentale per guidare e stimolare la guarigione e la deposizione ossea. Negli ultimi anni la stampa tridimensionale (3D) ha permesso di creare *scaffold* con un'architettura 3D controllata (9-11), migliorando così la loro biocompatibilità (12). Tuttavia, l'ultima generazione di sostituti ossei sintetici richiede ancora molto tempo per rigenerare una grande quantità di tessuto osseo limitando così il loro uso chirurgico in protocolli terapeutici convalidati come l'aumento del seno (13).

Dal momento invece che le terapie basate su cellule sono una strategia emergente per migliorare la guarigione e la rigenerazione del tessuto osseo (14-15), in collaborazione con la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Teramo è stato effettuato uno studio (16) in cui si è utilizzato uno *scaffold* sintetico di calcio-fosfato, realizzato mediante tecnica diretta di prototipazione rapida, sul quale sono state caricate delle cellule progenitrici, le cellule epiteliali amniotiche (*Amniotic Epithelial Cells*, AEC), per valutare la loro proprietà rigenerativa ossea per il rialzo del seno mascellare in un modello animale.

Sono stati realizzati due blocchi di sostituto osseo sintetico realizzato con HA e beta-fosfato tricalcico (β -TCP), uno di controllo e uno ingegnerizzato con cellule AEC; sono stati poi innestati bilateralmente in seni mascellari di sei pecore adulte (modello animale scelto per il suo alto valore traslazionale in odontoiatria). Le pecore sono state quindi divise casualmente in due gruppi e sacrificate a 45 e 90 giorni dall'impianto. La rigenerazione tissutale è stata poi valutata negli espianti sinusali mediante la microtomografia assiale computerizzata e l'analisi istologica al fine di valutare l'integrazione dei biomateriali nel tessuto ospite.

L'analisi microtomografica 3D visibile in Figura 1 ha distinto tra tessuto osseo (colore verde) e sostituto osseo (colore nero), consentendo così di osservare il processo di generazione dell'osso e l'integrazione dello *scaffold* dopo gli impianti sinusali. La micro-CT ha rivelato diversi ponti

ossei appena depositati, distribuiti tra l'osso nativo e la periferia dello *scaffold* sia nel campione controllo (CTR) che in quello trattato con AEC ovine (*ovine Amniotic Epithelial Cells*, oAEC). Focolai di formazione ossea sono stati rilevati anche nel nucleo dei seni trattati con oAEC in modo diverso rispetto al CTR.

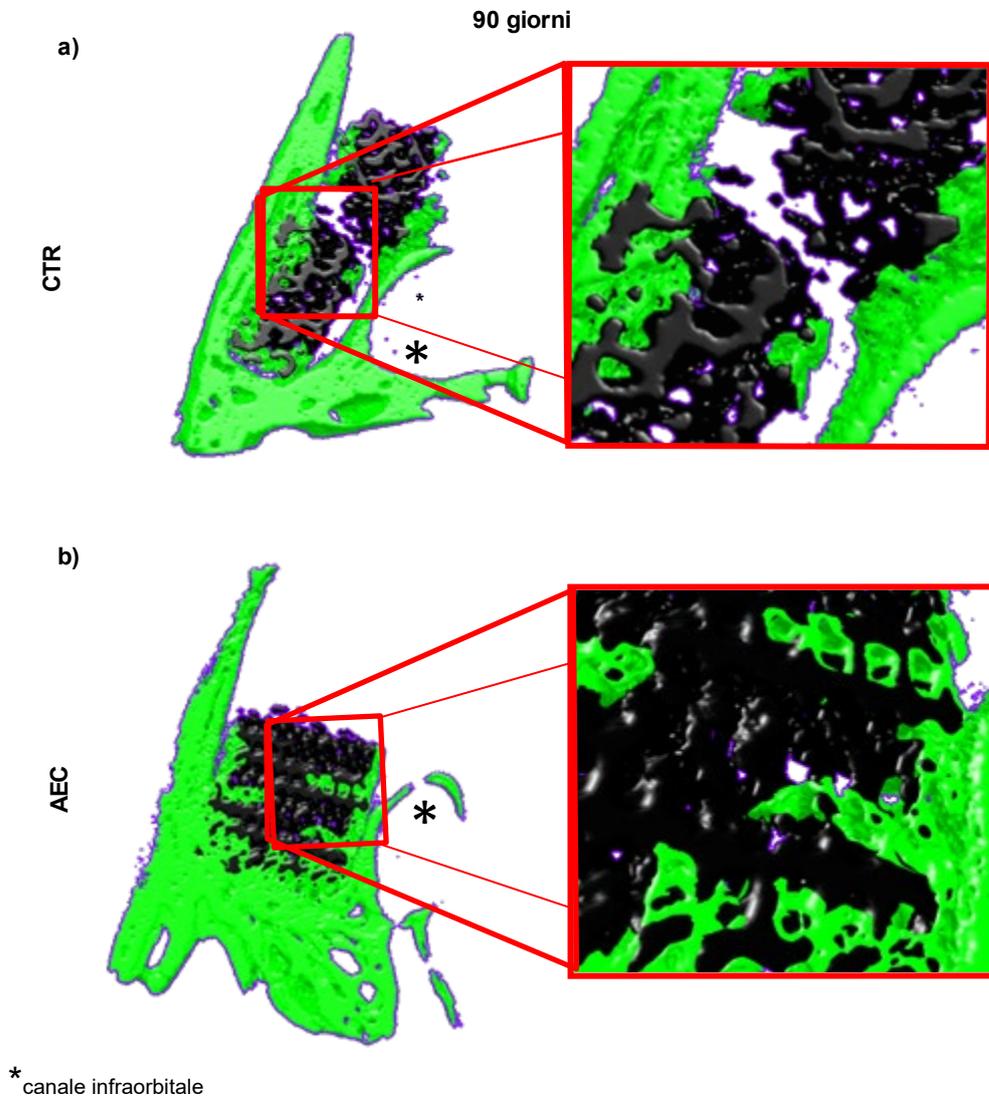


Figura 1. Analisi Micro-CT e ricostruzione 3D di espanti sinusali isolati dopo 90 giorni post-impianto eseguito con (A) lo *scaffold* da solo (campione di controllo, CTR) o (B) dopo l'ingegnerizzazione con oAEC (AEC). Le diverse densità tissutali sono state descritte da una scala cromatica arbitraria che mostra, rispettivamente, in verde il tessuto osseo e in nero il biomateriale (Foto: Istituto Superiore di Sanità, 2012)

I dati ottenuti suggeriscono che l'integrazione dello *scaffold* e la deposizione ossea sono influenzati positivamente dalle cellule AEC allotrapiantate. Gli espanti sinusali derivati da ovini innestati con *scaffold* ingegnerizzati con AEC hanno mostrato una ridotta reazione fibrotica, una risposta infiammatoria limitata e un processo accelerato di angiogenesi.

Inoltre, la presenza di oAEC ha stimolato in modo significativo l'osteogenesi sia migliorando la deposizione ossea sia rendendo più estesi i fuochi della nucleazione ossea. Oltre al ruolo di stimolazione svolto da oAEC negli eventi cruciali che guidano con successo la rigenerazione tissutale, i dati ottenuti da questo studio mostrano che oAEC sono state anche in grado di partecipare direttamente al processo di deposizione ossea, come suggerito dalla presenza di oAEC intrappolate all'interno della matrice osteoide di nuova deposizione e dalla loro capacità di attivare l'espressione di una specifica proteina legata all'osso (osteocalcina) quando viene trapiantata nei tessuti dell'ospite.

La micro-CT prima e l'analisi istologica dopo confermano che la deposizione ossea ha coinvolto principalmente la periferia dell'area innestata creando ponti di integrazione ossea tra lo *scaffold* e il neo osso a 90 gg dalla procedura di rialzo del seno. Il processo di deposizione di osso, inoltre, è stato anche accompagnato da un progressivo degrado dello *scaffold*, diventato significativamente rilevante a 90 gg.

Un altro studio, in collaborazione con il Dipartimento di Ortopedia e Traumatologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, è stato effettuato per valutare una nuova metodica di terapia genica *ex vivo* per indurre l'osteogenesi sia per applicazioni in odontostomatologia che in ortopedia (17).

Il trasferimento genico locale della *Lim Mineralization Protein* (LMP) umana, un nuovo regolatore positivo intracellulare del programma di differenziazione degli osteoblasti, può indurre una formazione ossea efficiente.

Al fine di sviluppare un approccio di terapia genica clinicamente rilevante per facilitare la guarigione ossea (18), sono state utilizzate culture di fibroblasti cutanei autologhi la cui realizzazione *in vitro* è estremamente semplice e che hanno il notevole vantaggio di essere ottenibili rapidamente con una semplice biopsia cutanea.

Le cellule così ottenute sono state poi modificate *ex vivo* con Ad-LMP-3 (*Adenovirus* per l'espressione della LMP-3) e ritrapiantate, tramite uno *scaffold* osteoconduttivo composto per il 20% di idrossiapatite (HA) e per l'80% di collagene (COL), in due differenti modelli animali sperimentali:

- modello di fusione vertebrale in topi immunocompetenti;
- modello di difetto osseo critico di mandibola in ratti immunocompetenti.

Entrambi i modelli sono stati sottoposti a radiografie, analisi microtomografiche attraverso la micro-CT e infine analisi istologiche; in particolare per l'analisi microtomografica è stata sezionata una porzione significativa dell'animale trattato.

Nel caso del modello di fusione vertebrale è stata sezionata e isolata una parte della spina dorsale circondata bilateralmente dai muscoli paravertebrali nei quali è stato inserito lo *scaffold* seminato con le cellule di fibroblasti. I campioni così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi microtomografica che ha rilevato una struttura ossea visibile nelle Figure 2c, 2d, 2f, 2g e avente densità uguale a quella dell'osso vertebrale, come confermato dall'analisi e dalla ricostruzione 3D della singola massa neoformata (Figure 2i e 2j), inoltre nelle sezioni trasversali, è possibile notare la presenza di macchie di densità corticale (Figura 2j). Il volume medio dell'osso neoformato, calcolato misurando i diametri della massa in diverse sezioni trasversali per ciascun animale, è stato di $100 \pm 7 \text{ mm}^3$.

Nessuna struttura ossea, invece, è stata osservata dalla ricostruzione 3D di animali controllo (Figura 2a) e di animali trattati con cellule non trasdotte (Figura 2b).

Dal confronto delle immagini microtomografiche 3D ottenute da animali controllo e animali trattati con LMP3 due mesi dopo l'intervento chirurgico possiamo vedere che non è stata rilevata nessuna massa significativa di struttura ossea o simile negli animali trattati con cellule non trasdotte seminate su *scaffold* (Figura 2a, la freccia indica il sito di impianto) o con *scaffold* nudo

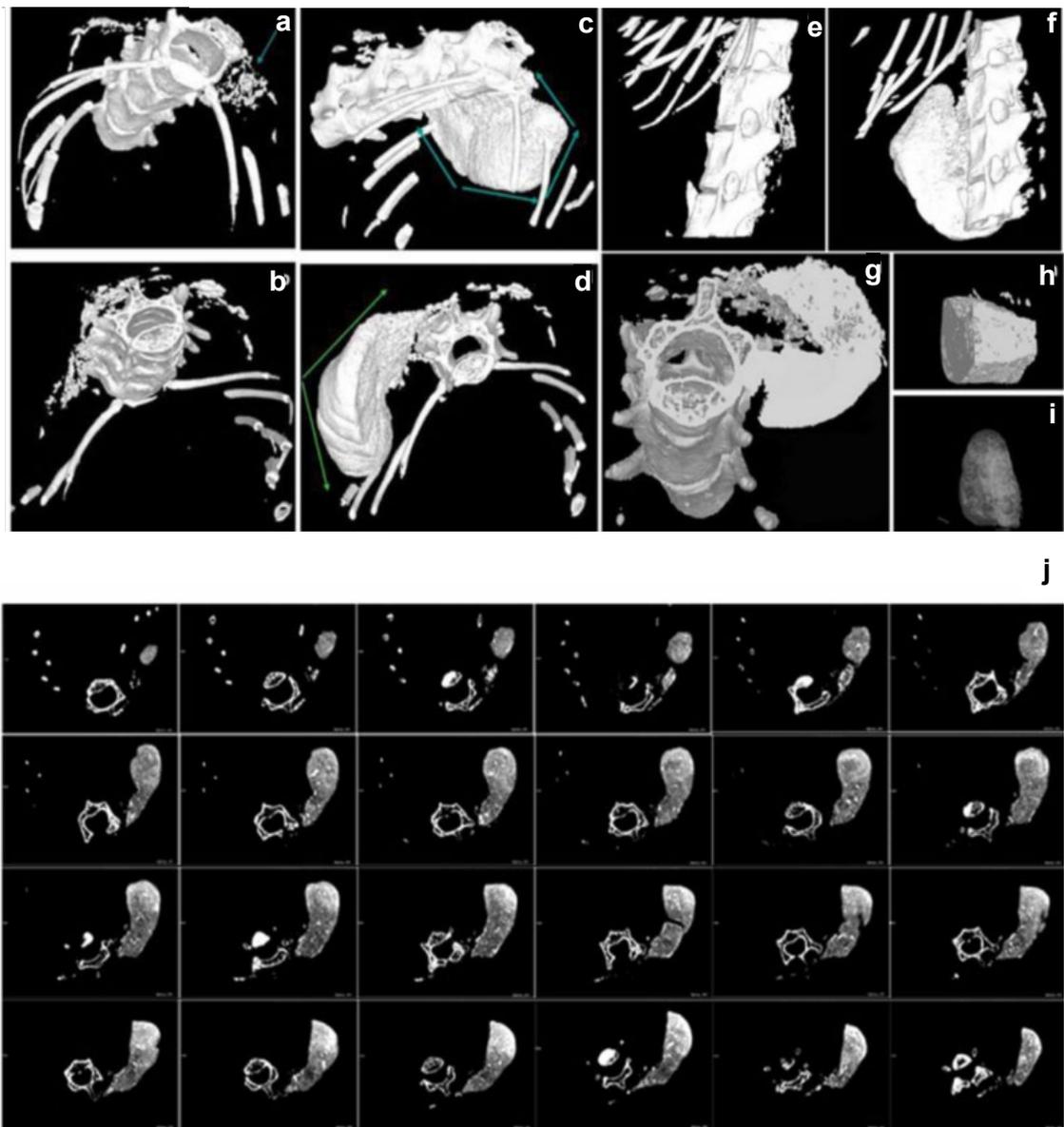


Figura 2. Analisi microtomografica e ricostruzione 3D della colonna vertebrale di animale trattato con cellule non trasdotte (a,e), di animale controllo (b), di animale trattato con cellule trasdotte (c,d,f,g); ricostruzione 3D della massa neoformata (h,i); sezioni trasversali assiali seriali di animale trattato con cellule trasdotte (j) (Foto: Istituto Superiore di Sanità, 2012)

(Figura 2b); viene rilevata invece la nuova formazione ectopica dell'osso (indicata dalle frecce in Figura 2c e 2d), in animali trattati con fibroblasti autologhi modificati da Ad.LMP-3 due mesi dopo l'intervento. I risultati sono confermati anche in una ricostruzione della vista laterale 3D; infatti vediamo in Figura 2e una ricostruzione 3D del topo trattato con lo *scaffold* non seminato con fibroblasti e in Figura 2f una ricostruzione 3D dell'animale trattato con LMP3 in cui è visibile la presenza di una massa neoformata che mostra la stessa densità dell'osso corticale sia in vista assiale (Figura 2g) sia nella ricostruzione 3D di due sezioni del nuovo osso formato (Figura 2h,

2i). I pannelli inferiori (Figura 2j) mostrano sezioni trasversali assiali seriali di un topo trattato con LMP-3 che mostrano macchie di densità ossea corticale all'interno della massa neoformata che fiancheggia la spina dorsale. Nel caso del modello di difetto osseo critico di mandibola, il cranio dei ratti sottoposti a tale trattamento è stato isolato preservando muscoli e tessuti molli. In questo modello, è stato creato un difetto di 5×5 mm nella faccia della mandibola dietro la radice dell'incisivo senza interrompere la continuità ossea. Il difetto è stato poi riempito in alcuni ratti con *scaffold* seminato con cellule LMP3-trasdotte (gruppo 1) e in altri con *scaffold* nudo di controllo (gruppo 2).

Entrambi i gruppi sono stati sottoposti ad analisi microtomografica: nel gruppo 2 di controllo (Figura 3a) non è stata osservata nessuna formazione ossea, mentre nel gruppo 1 l'analisi ha rilevato la corretta riparazione dei difetti impiantati (Figura 3b-d).

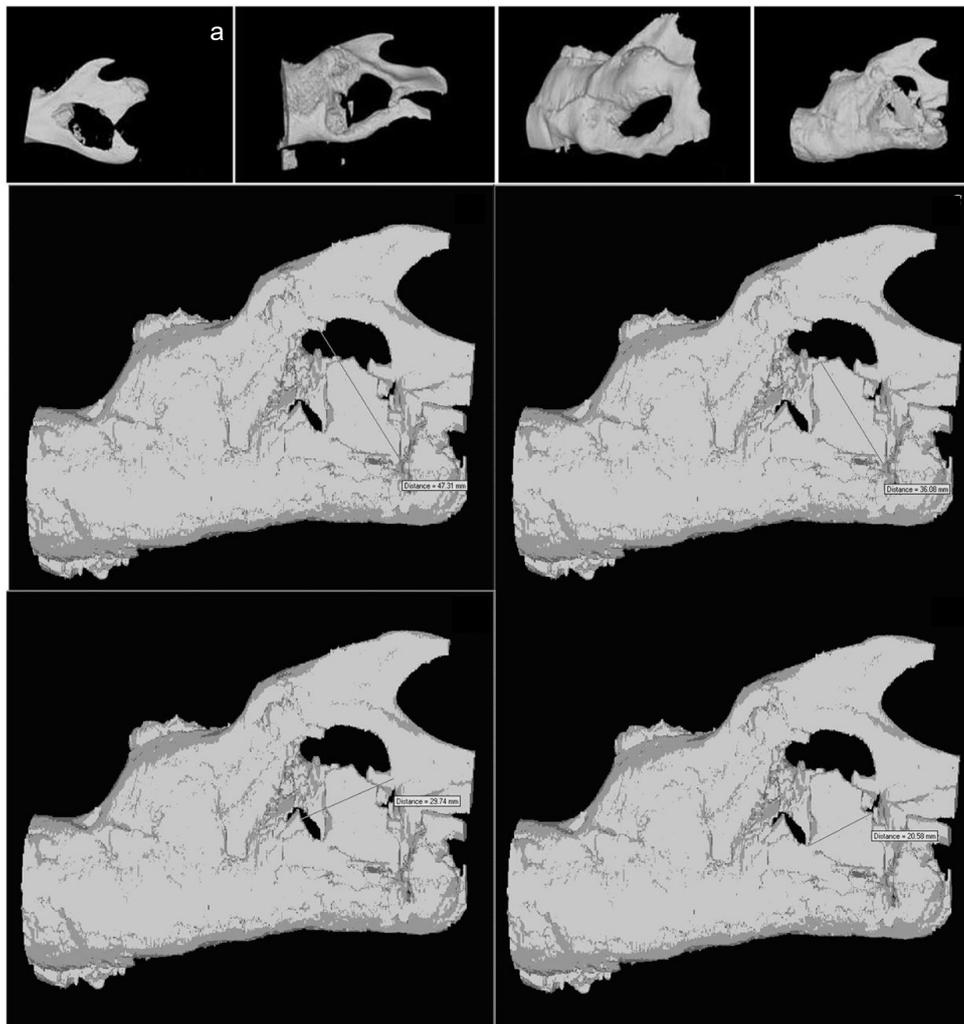


Figura 3. Ricostruzione 3D della mandibola di controllo trattata con *scaffold* non seminato (a), della mandibola trattata con cellule LMP3 dopo 4 settimane (b), dopo 8 settimane (c) e dopo 12 settimane (d). Diametri maggiori dell'intera area del difetto (e) e della nuova massa densa formata (f) e diametri minori dell'intera area del difetto (g) e della nuova massa densa formata (h) (Foto: Istituto Superiore di Sanità, 2012)

La nuova superficie ossea è stata calcolata in base al cranio CT (Figura 3e-h). L'area media dell'osso appena formato nel ratto della mandibola era $100 \pm 4 \text{ mm}^2$, mentre l'area media del difetto osseo originale era di $133 \pm 2 \text{ mm}^2$.

Dalle immagini microtomografiche 3D ottenute dalle mandibole di ratto dopo il sacrificio è possibile vedere l'assenza di qualsiasi struttura nella mandibola di controllo trattata con scaffold non seminato (Figura 3a); mentre è presente, invece, una nuova formazione ossea locale, che riempie parzialmente il gap osseo, nella mandibola trattata con cellule LMP3 trasdotte e seminate, come precedentemente detto, su scaffold di HA/COL per 12 settimane dopo l'intervento chirurgico (Figura 3d); nulla si evince nei campioni trattati dopo 4 settimane (Figura 3b) e dopo 8 settimane (Figura 3c).

È possibile vedere le misure dei diametri maggiori rispettivamente dell'intera area del difetto (Figura 3e) e della nuova massa densa formata (Figura 3f); mentre le Figura 3g e 3h mostrano i diametri minori rispettivamente dell'intera area del difetto e della nuova massa densa formata; le quattro immagini provengono tutte dallo stesso animale. Le superfici del difetto e della nuova massa neoformata sono state calcolate evidenziando le rispettive aree (Figura 4) e utilizzando i software in dotazione con la micro-CT.

Presi insieme questi risultati dimostrano che la trasduzione di Ad.LMP-3 in fibroblasti dermici autologhi seguita da impianto su scaffold di HA/COL si traduce in una efficiente formazione ossea in due diversi modelli di formazione ossea ectopica.

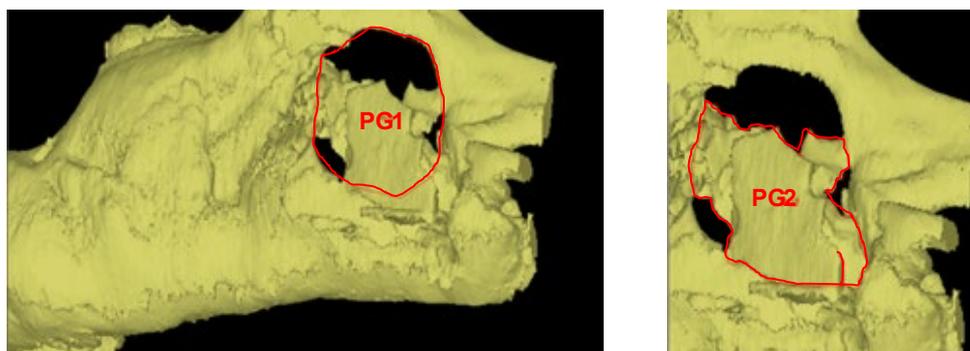


Figura 4. PG1 rappresenta l'intera area del difetto, mentre PG2 rappresenta l'area della massa neoformata. (Foto: Istituto Superiore di Sanità, 2012)

I risultati ottenuti dimostrano l'efficacia della metodica in tutti i modelli utilizzati per l'induzione dell'osso, confermando le proprietà osteoinduttive di LMP-3 *in vivo*; dimostrano anche l'efficacia del modello di scaffold in HA/COL, ma soprattutto l'utilizzo di fibroblasti cutanei autologhi impiantati su un biomateriale rappresenta un approccio promettente per possibili applicazioni cliniche future volte a indurre neo formazione ossea e aprendo interessanti prospettive per una possibile sperimentazione clinica sull'uomo.

Bibliografia

1. Davis GR, Wong FS. X-ray microtomography of bones and teeth. *Physiol Meas* 1996;17(3):121-46.
2. Rueggsegger P, Koller B, Muller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 1996;58(1):24-9.

3. Muller R, Ruegsegger P. Micro-tomographic imaging for the nondestructive evaluation of trabecular bone architecture. In: Lowet G, Ruegsegger P, Weinans H, Meunier A, eds. *Bone research in biomechanics*. Amsterdam: IOS Press; 1997. p. 61-79.
4. Campioni I, Pecci R, Bedini R. Ten years of micro-CT in dentistry and maxillofacial surgery: a literature overview. *Applied Sciences* 2020;10(12):4328.
5. Bedini R, Pecci R, Meleo D, Campioni I. Bone substitutes scaffold in human bone: comparative evaluation by 3D Micro-CT Technique. *Applied Sciences* 2020;10:3451.
6. Dorozhkin S, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002; 41:3130-146.
7. Egli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop Relat Res* 1988;232:127-38.
8. Kühne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, et al. Boneformation in corallinehydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1994;65:246-52.
9. Hollister S. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 2005;4:518-24.
10. Lee M, Dunn J, Wu B. Scaffold fabrication by indirect three dimensional printing. *Biomaterials* 2005;26:4281-289.
11. Adachi T, Osako Y, Tanaka M, Hojo M, Hollister SJ. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials* 2006; 27:3964-72.
12. Schumacher M, Deisinger U, Detsch R, Ziegler G. Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:3119-127.
13. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:4970.
14. Beyth S, Schroeder J, Liebergall M. Stem cells in bone diseases: current clinical practice. *Br Med Bull* 2011;99:199-210.
15. Ward BB, Brown SE, Krebsbach PH. Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies. *Oral Dis* 2010;16:709-16.
16. Barboni B, Mangano C, Valbonetti L, Marruchella G, Berardinelli P, Martelli A, Muttini A, Mauro A, Bedini R, Turriani M, Pecci R, Nardinocchi D, Zizzari VL, Tetè S, Piattelli A, Mattioli M. Synthetic bone substitute engineered with amniotic epithelial cells enhances bone regeneration after maxillary sinus augmentation. *PLoS One* 2013;8(5):e63256.
17. Lattanzi W, Parrilla C, Fetoni A, Logroscino G, Straface G, Pecorini G, Stigliano E, Tampieri A, Bedini R, Pecci R, Michetti F, Gambotto A, Robbins PD, Pola E. Ex vivo-transduced autologous skin fibroblasts expressing human Lim mineralization protein-3 efficiently form new bone in animal models. *Gene Ther* 2008;15(19):1330-43.
18. Pola E, Lattanzi W, Oggiano L, Logroscino G, Tampieri A, Bedini R, Pecci R, Robbins P.D. New ex-vivo approach of gene therapy by implantation of genetically modified autologous dermal fibroblasts expressing HLMP3 induces ectopic bone formation and healing of critical size mandibular bone defects. *Journal of Orthopaedics and Traumatology* 2007;8:S1-S120.

STUDIO DELL'INTERAZIONE TRA TESSUTO E BIOMATERIALE CON TECNICHE FISICHE AVANZATE BASATE SULL'UTILIZZO DELLA RADIAZIONE DI SINCROTRONE: APPLICAZIONI IN ORTOPEDIA E ODONTOIATRIA

Alessandra Giuliani

Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche, sezione di Biochimica, Biologia e Fisica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Negli ultimi anni si sta manifestando un interesse sempre crescente per un approccio innovativo, capace di analizzare le performance *in-vivo* di diverse tipologie di biomateriale in siti ortopedici e ortodontici, mediante microtomografia basata sulla radiazione X di Sincrotrone (*Synchrotron Radiation – micro Computed Tomography*, SR-micro-CT). Infatti, l'utilizzo della SR-micro-CT per lo studio della rigenerazione dei tessuti, utilizzando innesti di diversi tipi di biomateriale (con o senza la semina di cellule staminali) in siti ospite, è un metodo di studio molto recente. La valutazione del tessuto neoformato si basa di solito su dati istomorfologici, ottenuti da una o più sezioni istologiche; tuttavia, la valutazione istologica convenzionale e le corrispondenti misurazioni istomorfometriche forniscono solo informazioni 2D con il conseguente rischio che le sezioni selezionate non rappresentino correttamente l'intero campione biotico. Inoltre, qualora risulti importante valutare il potenziale rigenerativo dei tessuti coinvolti (osso, matrice extracellulare non mineralizzata, vascolarizzazione, ecc.) in un difetto o in un tessuto da rigenerare, metodi di analisi tridimensionale (3D), come la SR-micro-CT ad alta risoluzione, sono indicati per esplorare la distribuzione spaziale e dinamica dei fenomeni rigenerativi in tali strutture anatomiche.

Tradizionalmente, l'*imaging* ad assorbimento con la SR-micro-CT, specie nelle applicazioni biomediche per lo studio dell'osso, è condotto con distanza trascurabile tra campione e rivelatore. Purtroppo però, materiali omogenei con un coefficiente di attenuazione bassa (come il collagene, la matrice extracellulare non mineralizzata, i vasi, i nervi, ecc.) o materiali eterogenei con coefficienti di attenuazione in un *range* ristretto (come nel caso di *scaffold* di osso eterologo o per l'osso in fase di mineralizzazione) producono un contrasto insufficiente in configurazioni di *imaging* basate sull'assorbimento. Per tali materiali, la qualità delle immagini può essere incrementata attraverso l'uso della tomografia a contrasto di fase (*Phase Contrast* micro-CT, PhC-micro-CT), spesso (ma non sempre) ottenuta aumentando la distanza tra campione e rivelatore. Inoltre, considerando che la PhC-micro-CT spesso si basa su una singola distanza tra il rivelatore e il campione, con l'olotomografia (*Holotomography*, HT), che comporta invece un *imaging* su varie distanze, è possibile generare ricostruzioni 3D unendo le informazioni di sfasamento ottenute su ognuna di queste. La HT è utile quando il materiale di interesse presenti un coefficiente di attenuazione con minime variazioni all'interno del volume analizzato: questo in genere porta a risultati di *imaging* insoddisfacenti anche con tecniche di contrasto di fase su singola distanza.

Nella presente lettura sono state mostrate le più recenti osservazioni di SR-micro-CT in termini di *cross-talk* tra tessuto e biomateriali, dimostrando le capacità uniche delle tecniche di *imaging* di sincrotrone nell'offrire non solo una caratterizzazione avanzata dei diversi biomateriali (per

capire il meccanismo del loro comportamento biologico come sostitutivo del tessuto), ma anche per studiare la cinetica di crescita di tessuti rigenerati in diversi ambienti *in vitro* e *in vivo*.

Un nuovo approccio: l'*imaging* basato sulla radiazione X di sincrotrone

Le ricerche effettuate presso le strutture di sincrotrone hanno contribuito in modo considerevole, negli ultimi 20 anni, allo sviluppo della scienza moderna, con importanti ricadute anche in ambito ortopedico e odontoiatrico. Ma che cosa è un sincrotrone? Innanzitutto, è una sorgente estremamente potente di raggi X prodotti da elettroni molto energetici che si muovono in una grande installazione di forma circolare. La fisica che sottende alla produzione di raggi X presso il sincrotrone si basa su un unico principio: quando un elettrone in movimento cambia direzione, emette energia e questa energia è nel *range* energetico dei raggi X qualora gli elettroni si muovano a velocità prossime a quelle della luce. Quindi, il sincrotrone serve ad accelerare gli elettroni fino a velocità elevatissime per poi fargli cambiare direzione sotto l'azione forzata di campi magnetici. I raggi X prodotti sono quindi emessi e direzionati verso le diverse *beamlines* che circondano lo *storage ring*. Ogni *beamline* è stata progettata per effettuare presso di essa un tipo specifico di ricerca attraverso una tecnica di caratterizzazione ben determinata. Le tre importanti installazioni di sincrotrone europee sono: l'*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) di Grenoble (F), lo *Swiss Light Source* (SLS) al *Paul Scherrer Institut di Villigen* (CH) e il *Sincrotrone* del centro di ricerca internazionale ELETTRA di Basovizza (TS) (I).

Questi sincrotroni producono una radiazione (SR) con intensità di fascio di 12 ordini di grandezza superiore ai tubi standard a raggi X da laboratorio; per questo motivo il loro utilizzo è garantito da una comunità sempre crescente di utenti, diventando nel tempo il quartier generale delle ricerche più avanzate in un gran numero di settori scientifici, tra cui la chimica, la fisica, la biologia strutturale, la medicina, le scienze della terra, le scienze dei materiali e l'ingegneria, con un fortissimo interesse attuale per la nanoscienza.

In questo contesto, è indubbio che l'introduzione della tomografia computerizzata (CT) nell'*imaging* medico abbia rivoluzionato e fortemente migliorato non solo il settore diagnostico, ma anche la ricerca, con particolare riferimento ai distretti ossei. La CT evita quegli errori di diagnostica, tipici delle immagini radiografiche, dovuti alla sovrapposizione dei tessuti, e permette di analizzare in 3D e in modo non-distruttivo i suddetti tessuti, con un contrasto fino a mille volte superiore rispetto a quello di una radiografia convenzionale (1).

La micro-CT è simile alla CT convenzionale, solitamente utilizzata nella diagnostica medica, ma, a differenza di questa, che tipicamente raggiunge la massima risoluzione spaziale di circa 0,5 mm, la micro-CT è in grado di raggiungere una risoluzione spaziale fino a 0,2-0,3 μm , cioè circa tre ordini di grandezza al di sopra (2).

In particolare, la micro-CT basata sulla SR offre la possibilità di ottenere proiezioni radiografiche utilizzando fotoni appartenenti a una piccola porzione dello spettro energetico e, allo stesso tempo, garantisce un flusso di fotoni sufficientemente elevato per ottenere un *imaging* efficiente. Inoltre, l'uso della SR permette di modulare l'energia dei fotoni, con lo scopo di ottimizzare il contrasto tra le fasi rilevate nel costrutto di interesse. Questa opzione è di grande interesse qualora si vogliano eseguire delle analisi di micro-CT, in quanto consente di ottenere immagini ad alta risoluzione spaziale con un elevato rapporto segnale-rumore, permettendo anche di eseguire misurazioni di densità dopo calibrazione con diversi standard.

Tuttavia, è importante sottolineare che le sorgenti di sincrotrone di terza generazione, come ESRF o ELETTRA, producono fasci di fotoni con elevate proprietà di brillantezza e coerenza

spaziale, idonee non solo nell'ambito dell'*imaging* a raggi X basato su tecniche di attenuazione convenzionali, ma anche per applicazioni in contrasto di fase, offrendo spesso una maggiore sensibilità rispetto alle prime.

L'approccio offerto dal contrasto di fase (*Phase Contrast*, PhC) differisce dall'*imaging* a raggi X convenzionale, perché le immagini risultanti non sono basate unicamente sul contrasto di attenuazione. Infatti, l'effetto del fascio di raggi X che passa attraverso il campione è di solito descritto dall'indice di rifrazione n :

$$n(r) = 1 - \delta(r) + i\beta(r), \quad [1]$$

dove il decremento δ (delta) è legato allo sfasamento mentre β (beta) all'attenuazione del fascio di fotoni.

Essendo δ molto più grande di β nei tessuti non mineralizzati, l'approccio basato sul contrasto di fase fornisce una maggiore sensibilità rispetto a quello basato sull'assorbimento. δ è infatti proporzionale alla densità elettronica media, che a sua volta è quasi proporzionale alla densità di massa.

Questo guadagno in sensibilità può essere di diversi ordini di grandezza per materiali non mineralizzati, rendendo la PhC-micro-CT una tecnica di *imaging* molto attraente per lo studio dei tessuti biologici, con particolare riferimento agli innesti ossei dove troviamo osteociti, ossa in fase di rigenerazione e rimodellamento e la neo-vascularizzazione.

Purtroppo i set up di *imaging* a contrasto di fase tal quali non permettono di acquisire automaticamente informazioni quantitative, rendendo necessaria l'applicazione di algoritmi specifici, denominati di *Phase-Retrieval* (PR). Questi ultimi comunque, congiuntamente a una esposizione su tempi di acquisizione ridotti, consentono l'analisi quantitativa di questi tessuti biologici, grazie anche alle migliori performance di segmentazione delle diverse fasi rispetto alle configurazioni convenzionali.

Tipicamente il PR implica la ricostruzione di due differenti distribuzioni di valori reali per $\beta(r)$ e $\delta(r)$; tale ricostruzione richiede generalmente l'acquisizione di una serie di proiezioni 2D per ogni angolo di rotazione, per almeno due distanze tra campione e rivelatore. Tuttavia, in alcuni casi, si può dimostrare a priori che le distribuzioni delle parti reale e immaginaria dell'indice di rifrazione sono proporzionali fra loro, per esempio:

$$\beta(r) = \varepsilon \cdot \delta(r) \quad [2]$$

dove la costante di proporzionalità ε non dipende dalle coordinate spaziali. L'equazione [2] può essere applicata solo a tipologie di campione particolari, cioè a tessuti poco assorbenti e costituiti da singola fase, oppure campioni costituiti prevalentemente da un unico materiale con una densità variabile a livello spaziale (3). Quest'ultimo caso è rappresentato dalla maggior parte degli innesti ossei di tipo ortopedico e odontoiatrico, soprattutto nelle prime fasi della formazione ossea, quando vi è una variazione lenta della mineralizzazione (campione "monomorfo"). In queste situazioni, un'unica proiezione per ciascun angolo di vista si dimostra spesso sufficiente per la ricostruzione della distribuzione 3D dell'indice di rifrazione complesso (4).

Tuttavia, al fine di poter fare delle previsioni sulla durata in vita degli innesti ossei nei diversi siti scheletrici, non è più sufficiente lo studio esclusivo delle proprietà dei tessuti mineralizzati (come lo *scaffold* residuo e l'osso rigenerato) ma è anche fondamentale valutare la presenza, la distribuzione e poter quantificare i tessuti non-mineralizzati (osteociti, matrice extracellulare, vasi sanguigni, nervi, midollo osseo, ecc.) all'interno dei campioni analizzati. In questa direzione, un interesse crescente è posto da alcuni anni sulla vascularizzazione del distretto rigenerato (5,6).

In questo contesto, ha preso recentemente campo l'utilizzo di una nuova tecnica fisica basata sulla SR, cioè la olografia (*HoloTomography*, HT). I principi fisici della HT sono gli stessi

alla base della tomografia a contrasto di fase; si parte dalla equazione [1] ma, mentre la tomografia a contrasto di fase si basa spesso su una singola distanza tra il rivelatore e il campione, la HT comporta l'acquisizione di set radiografici su diverse distanze, combinando le informazioni di fase al fine di generare ricostruzioni 3D innovative e finemente dettagliate.

Il processo di ricostruzione delle immagini, che porta all'ottenimento delle mappe 2D di fase, può essere descritto tramite propagazione, defocalizzazione, e olografia in linea.

Il recupero delle mappe di fase 2D avviene in due fasi: nella prima si estrae la distribuzione 2D dello sfasamento del fascio di fotoni; nella seconda, le precedenti informazioni vengono convertite in uno *stack* di fette 2D, le mappe di fase, con l'algoritmo di retroproiezione filtrata (*Filtered Backprojection Method*, FBP).

In questo modo, le sezioni tomografiche mostrano le diverse distribuzioni di densità fisica all'interno dei campioni analizzati. Da queste differenze, si può valutare il grado di mineralizzazione. Inoltre, nelle ricostruzioni 3D è possibile osservare anche la presenza di nuovi vasi e della matrice extracellulare non mineralizzata (*ExtraCellular Matrix*, ECM), strutture biologiche che sono trasparenti nelle ricostruzioni tomografiche convenzionali basate sul contrasto di attenuazione (a causa dei loro coefficienti di attenuazione estremamente bassi).

La sezione seguente si concentra sull'analisi di alcune esperienze, effettuate tramite microtomografia e tramite l'innovativa tecnica dell'olotomografia, per applicazioni legate a problemi di ricerca nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo, con particolare riferimento ai siti ortopedici e allo studio degli innesti ossei del maxillofaciale.

Applicazioni in ortopedia e odontoiatria

La microtomografia basata sulla radiazione di sincrotrone (SR-micro-CT) fu impiegata, in una prima fase, per ricostruire ad alta risoluzione la complessa architettura del tessuto osseo.

Oggi invece sta diventando sempre più uno strumento potente per la caratterizzazione dell'osso ingegnerizzato (2). In questo contesto, diversi studi di SR-micro-CT sono stati effettuati su vari biomateriali, precedentemente indicati come candidati promettenti per la sostituzione ossea nei distretti scheletrici e dentali. Per esempio, sono noti in letteratura numerosi studi (7-9, 2) che dimostrano, tramite micro-CT, il ruolo bioattivo del tricalciofosfato (*TriCalcium Phosphate*, TCP) oppure del TCP in combinazione con idrossiapatite (*HydroxyApatite*, HA) per la rigenerazione ossea. In particolare, una rigenerazione efficiente dell'osso è stata ottenuta utilizzando sostitutivi ossei di calcio fosfato bifasico, come riportato recentemente in letteratura in merito ad alcune applicazioni cliniche per l'elevazione del seno mascellare (10, 11). Esistono infatti delle morfologie particolari per realizzare *scaffold* 3D, in forma granulare oppure a blocchi, potenzialmente ideali per essere utilizzati sia in una strategia acellulare (innesto dello *scaffold* tal quale, con conseguente colonizzazione da parte di cellule endogene) (11) che combinando *in vitro* il biomateriale con cellule (12). I precedenti studi erano tutti basati su un singolo *time-point* (6 mesi), ma una valutazione quantitativa delle cinetiche rigenerative su *scaffold* di calciofosfato bifasico è stata recentemente eseguita tramite SR-micro-CT (13). Ventiquattro potenziamenti bilaterali del seno mascellare sono stati eseguiti tramite innesto con HA/ β -TCP 30/70, 12 con sostitutivi di forma granulare e 12 con blocchi a elevata porosità. In seguito, sono stati effettuati dei carotaggi a tempi diversi dalla data di innesto e le biopsie sono state valutate in termini di rigenerazione ossea, riassorbimento dello *scaffold*, neo-vascularizzazione, e valutando i parametri morfometrici. Si è osservata, tramite micro-CT, una grande quantità di osso neoformato, unitamente a una buona velocità di riassorbimento del biomateriale e alla formazione di una rete omogenea e ricca di nuovi vasi. I valori morfometrici risultanti dall'analisi degli innesti eseguiti utilizzando le due morfologie (granuli e blocchi) di *scaffold* erano comparabili a 5/6 mesi dal *grafting*, ma a 9 mesi, le rigenerazioni basate sui blocchi mimavano leggermente meglio i siti

ossei sani mascellari rispetto a quelli rigenerati partendo da supporti granulari. Questo studio mostra un esempio delle possibilità offerte dalla SR-micro-CT per valutare con precisione la cinetica sul lungo termine della crescita ossea negli innesti, favorendo così un confronto preciso tra le diverse morfologie dello *scaffold* di partenza. Un altro esempio di materiale ceramico noto per la sua capacità di stimolare la rigenerazione ossea è il calcio fosfato di derivazione corallina (Biocoral) (14, 15). Anche in questo caso la SR-micro-CT è stata utilizzata per analizzare la microarchitettura porosa 3D dello *scaffold*, valutando le cinetiche di rigenerazione ossea a lungo termine (16). Dopo 6/7 mesi dall'innesto in difetti ossei mascellari umani sono stati valutati la sopravvivenza dell'impianto, la rigenerazione ossea, il riassorbimento dello *scaffold*, la neovascolarizzazione e altri parametri morfometrici come l'anisotropia e l'indice di connettività delle strutture. I campioni di Biocoral hanno favorito la rigenerazione di una grande quantità di osso, fenomeno accoppiato a un buon tasso di riassorbimento del biomateriale stesso e alla formazione di una rete omogenea e ricca di nuovi vasi.

In Figura 1 sono state rappresentate alcune ricostruzioni di micro-CT di porzioni di innesto mascellare ottenuti utilizzando (a) Biocoral poroso, (b) β -TCP a blocco (bassa porosità), e (c) uno *scaffold* HA (30%)/TCP (70%) a elevata porosità. In tutti i volumi rappresentati, la fase vascolare appare in verde, l'osso neoformato in rosa, e lo *scaffold*, indipendentemente dal biomateriale specifico, in bianco. È stato possibile visualizzare anche i vasi neoformati perché il *set-up* sperimentale scelto, conteneva non solo il segnale di assorbimento, ma anche quello relativo al contrasto di fase, consentendo anche la visualizzazione di questi tessuti non mineralizzati.

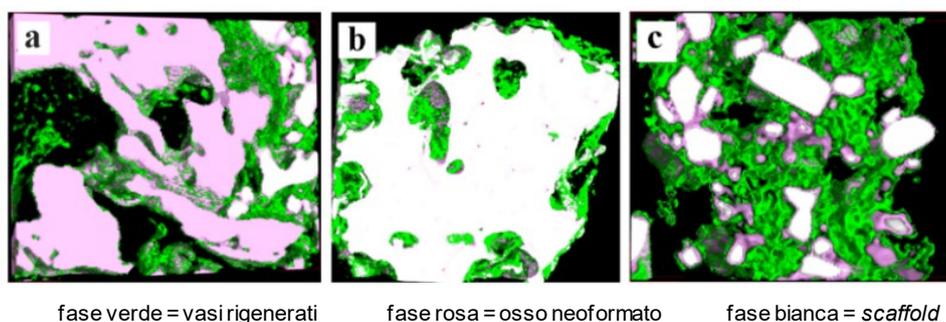


Figura 1. Proprietà rigenerative di diversi innesti in difetti mascellari umani osservate tramite SR-micro-CT: (a) derivato corallino (Biocoral) dopo permanenza *in vivo* per 6 mesi; (b) blocco in β -TCP dopo permanenza *in vivo* per 6 mesi; (c) TCP70%/HA 30% dopo permanenza *in vivo* per 7 mesi. (Foto: Giuliani A., 2016) (17)

Il campione con supporto di Biocoral (Figura 1a) presentava una grande quantità di osso neoformato, con residui di biomateriale, ancora non completamente riassorbito dopo 6 mesi dall'innesto. Nel campione con *scaffold* a blocco in β -TCP (Figura 1b), i risultati sono stati completamente diversi: si osserva solo una minima quantità di osso rigenerato, soprattutto circostante e in aderenza con i grani TCP periferici. Infine in Figura 1c, il TCP/HA, in analogia con il comportamento del Biocoral, evidenzia una quantità rilevante di osso rigenerato. L'analisi morfometrica 3D ha confermato queste evidenze, dimostrando che la microstruttura dell'osso derivante dal Biocoral è paragonabile a quello ottenuto a partire dal calcio fosfato bifasico, con l'eccezione dell'indice di connettività per cui il controllo TCP/HA mostra strutture meglio connesse. Al contrario, il blocco di TCP mostrava caratteristiche morfometriche peggiori in termini di osso neoformato, a motivo della quasi assenza di macroporosità. Questi dati morfometrici hanno confermato che, nonostante siano note in letteratura le ottime prestazioni del

β -TCP per gli innesti ossei, le caratteristiche morfometriche particolari del blocco di TCP utilizzato non favoriscono la rigenerazione ossea. Questo fatto e le analisi di micro-CT in generale confermano che il tasso di successo di un impianto sembra strettamente dipendente non solo sulle proprietà biochimiche ma anche dalla morfologia del biomateriale (16).

Le esperienze di ricerca precedentemente descritte confermano inoltre la capacità della SR-micro-CT di estrarre parametri morfometrici affidabili a livello 3D. Ciò risulta di fondamentale importanza perché, se da un lato i risultati istologici sono riprodotti con notevole fedeltà dalle indagini di micro-CT, in questo modo è anche possibile superare i limiti istologici di non risolvere correttamente le informazioni strutturali 3D.

La PhC-micro-CT su singola distanza è stata invece utilizzata in due recenti studi delle prime fasi di formazione ossea su *scaffold* di osso eterologo collagenato (DB), posto in coltura *in vitro* con cellule staminali umane del legamento parodontale (*human Periodontal Ligament Stem Cells*, hPDLSC) (17, 18). Confrontando il potenziale osteogenico di tale costruito tra cultura basale e mezzo differenziante, sono stati studiati i meccanismi del suo comportamento biologico in vista di un possibile utilizzo per innesto in difetto umano. Le PDLSCs umane, sono state ottenute mediante raschiatura delle fibre orizzontali alveolari del legamento parodontale, e sono state seminate su *scaffold* collagenati di origine suina, costituiti da osso spongioso e corticale.

Le immagini 3D sono state ottenute tramite SR-micro-CT, mediante una configurazione di contrasto di fase, ed elaborate con un algoritmo di *PageRank* (PR) basato sulla *Transport of Intensity Equation* (TIE) (3, 19). A partire dalla prima settimana di coltura in terreno *xeno-free* e dalla seconda settimana in terreno non *xeno-free*, è stata osservata una neoformazione di osso mineralizzato su tutti gli *scaffold*, sia in coltura basale che in quella osteogenica. È stato dimostrato che la mineralizzazione dell'osso avviene preferenzialmente nelle colture in mezzo osteogenico, ma la presenza di mineralizzazione anche su terreno basale ha evidenziato in modo inequivocabile quanto gli *scaffold* collagenati di origine suina siano ottimi candidati come sostitutivi ossei. In Figura 2 sono rappresentate alcune colture *xeno-free* di PDLSCs umane su DB in terreno basale (CTR) e osteogenico (differenziante, DIFF) a 1 o 3 settimane dalla semina.

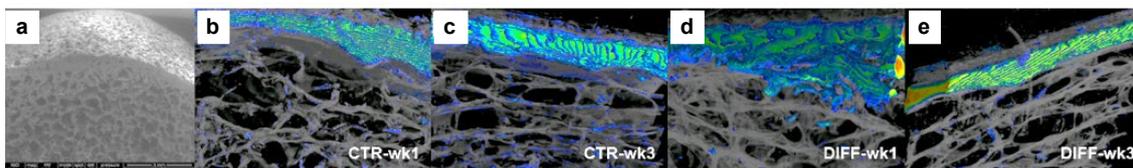


Figura 2. Colture *xeno-free* di PDLSCs umane su DB in terreno basale (CTR) e osteogenico (differenziante, DIFF) a 1 o 3 settimane dalla semina. Scala: da 10 μ m (blu) a 390 μ m (rosso). (Foto: Mazzoni S., 2017) (18)

Si evidenzia in particolare: nell'immagine (a) è riportata un'immagine al SEM dello *scaffold* collagenato prima della semina delle PDLSCs. Le immagini (b-e), effettuate con SR-micro-CT, rappresentano immagini 3D di scaffold collagenati di origine suina (DB) posti in coltura con cellule staminali umane del legamento parodontale, su terreno basale (CTR) o differenziante (DIFF).

In particolare nell'immagine (b) vediamo i risultati dopo 1 settimana di coltura CTR; in (c) dopo 3 settimane di coltura CTR; in (d) dopo 1 settimana di coltura DIFF; e infine in (e) dopo 3 settimane di coltura DIFF. L'interazione tra le cellule e lo scaffold produce immagini 3D di micro-CT con due diverse fasi, corrispondenti a valori diversi di δ (decremento dell'indice di rifrazione).

Gli *scaffold* sono resi in grigio, mentre il contrasto prodotto dalle cellule – cioè l'osso neoformato – è colorato utilizzando una mappa di colori che rappresenta la distribuzione dello spessore osseo mineralizzato.

La porzione mineralizzata viene evidenziata utilizzando una mappa di colori che rappresenta la distribuzione di spessore dell'osso mineralizzato, mentre la matrice collagenata è rappresentata in grigio.

È interessante notare come le analisi di micro-CT abbiano anche rivelato una diminuzione della densità di massa degli *scaffold* seminati con hPDLSC, in entrambi i terreni di coltura, dalla prima alla seconda settimana, mentre un lieve aumento è stato osservato dalla seconda alla terza settimana (17). Questo sembra indicare che il riassorbimento dello *scaffold* è più accentuato fino alla seconda settimana di coltura. Nelle esperienze di SR-micro-CT precedentemente illustrate abbiamo visto come l'utilizzo del contrasto di fase su singola distanza risulti essere utile quando il materiale di interesse presenti delle variazioni del coefficiente di attenuazione molto piccole. Talora però, anche utilizzando questa tecnica, i risultati di *imaging* possono rimanere insoddisfacenti. Questo è il caso, come sperimentato e ampiamente discusso in bibliografia (20, 21), quando si vogliono studiare nel dettaglio non solo i processi di mineralizzazione delle ossa, come quelli derivanti da cellule staminali trapiantate su *scaffold*, ma anche la angiogenesi e microvasculogenesi di un qualunque sistema biologico in ingegneria tissutale. Una simile esperienza è stata presentata per la prima volta da Komlev (20). In questo lavoro, un composito di TCP stabilizzato con silicio e posto in coltura con cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC) è stato impiantato sottocute nel dorso di topi immunodeficienti. I topi sono stati sacrificati 24 settimane dopo l'impianto e i costrutti estratti sono stati studiati tramite micro-CT e HT. Le immagini 3D di micro-CT sono state ricostruite da serie di proiezioni 2D utilizzando un algoritmo di retroproiezione filtrata (FBP), mentre le acquisizioni "olografiche" sono state trattate, a ogni distanza tra campione e rivelatore, con una procedura di PR partendo da un algoritmo TIE con successiva ricostruzione delle immagini 3D tramite FBP convenzionale. Al fine di utilizzare le informazioni derivanti sia dalle mappe di $\delta(x, y, z)$ che di $\beta(x, y, z)$, è stata utilizzata una procedura di allineamento ottimizzata per una ricostruzione olografica, pesata sui tre volumi ricostruiti ad altrettante distanze campione-rivelatore. Di conseguenza, questi volumi sono stati allineati in uno, usando il cosiddetto processo pseudo-HT. Con questa tecnica, senza avere utilizzato alcun agente di contrasto per identificare il microcircolo sanguigno, sono stati simultaneamente visualizzati e quantificati i tessuti molli e la rete vascolare.

In un secondo lavoro (21), la stabilità e la qualità della struttura ossea e dei vasi rigenerati sono stati valutati con procedure di HT in linea, negli innesti di mandibola, realizzati con cellule staminali della polpa dentale precedentemente seminate su supporti di collagene I, tre anni dopo l'intervento di innesto. In questo studio, è stato utilizzato un metodo innovativo per il PR, recentemente sperimentato e descritto da Langer (22). La HT ha consentito non solo di acquisire informazioni qualitative e quantitative sul tessuto osseo, rivelando che l'osso neoformato è di tipo compatto (piuttosto che di tipo spugnoso, come fisiologico per il sito di innesto), ma anche di valutare la presenza, la distribuzione e di quantificare i tessuti non mineralizzati (osteociti, matrice extracellulare, vasi sanguigni, nervi, ecc.) all'interno dei campioni analizzati. Oltre ai risultati specifici in precedenza descritti, la tecnica di HT potrebbe essere di interesse molto più generale se si considera l'ingegneria tissutale come approccio terapeutico in campo Ortopedico e Odontoiatrico. In particolare, l'avanzamento associato a questa tecnica potrebbe essere estrapolato a studi di angiogenesi e microvasculogenesi nelle patologie caratterizzate da infiammazione e danni ai tessuti come il diabete e l'osteoporosi.

Conclusioni

Rigenerazione tissutale, riassorbimento del biomateriale, parametri morfometrici (compresi anisotropia e indice di connettività delle strutture), e neo-vascularizzazione sono stati valutati tramite SR-micro-CT e HT a tempi diversi dall'innesto sia *in vitro* che *in vivo*.

Queste tecniche innovative hanno consentito non solo la visualizzazione e la quantificazione dei tessuti, ma sono state anche in grado di rilevare in 3D l'eventuale presenza e distribuzione della neo-vascularizzazione.

Questo è di fondamentale importanza, e dimostra che la tomografia in contrasto di fase e l'olotomografia, entrambe basate sull'utilizzo della radiazione di sincrotrone, presentano le potenzialità per essere considerate metodi fondamentali per studiare le interazioni tra tessuti e biomateriali.

Bibliografia

1. Claesson T. *A medical imaging demonstrator of computed tomography and bone mineral densitometry*. Stockholm: Universitetsservice; 2001.
2. 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.
3. Gureyev TE, Pogany A, Paganin DM, Wilkins SW. Linear algorithms for phase retrieval in the Fresnel region. *Opt Commun* 2004;231(1-6):53-70
4. Gureyev TE, Paganin DM, Myers GR, Nesterets YaI, Wilkins SW. Phase-and-amplitude computer tomography. *Appl Phys Lett* 2006;89(3):034102
5. Pogrel MA, Podlesh S, Anthony JP, Alexander J. A comparison of vascularized and nonvascularized bone grafts for reconstruction of mandibular continuity defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(11):1200-6
6. Foster RD, Anthony JP, Sharma A, Pogrel MA. Vascularized bone flaps versus nonvascularized bone grafts for mandibular reconstruction: An outcome analysis of primary bony union and endosseous implant success. *Head Neck* 1999;21(1):66-71
7. Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Baslé MF, Libouban H. Sinus lift augmentation and beta-TCP: a micro-CT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron* 2010;41(4):321-326.
8. Kim YH, Jyoti MA, Youn MH, Youn HS, Seo HS, Lee BT, Song HY. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a macro porous β -TCP granule-shaped bone substitute fabricated by the fibrous monolithic process. *Biomed Mater* 2010;5(3):35007.
9. Komlev VS, Mastrogiacomo M, Pereira RC, Peyrin F, Rustichelli F, Cancedda R. Biodegradation of porous calcium phosphate *scaffolds* in an ectopic bone formation model studied by x-ray computed microtomography. *Eur Cell Mater* 2010;19:136-46.
10. Mangano C, Perrotti V, Shibli JA, Mangano F, Ricci L, Piattelli A, Iezzi G. Maxillary sinus grafting with biphasic calcium phosphate ceramics: clinical and histologic evaluation in man. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28(1):51-6.
11. Ohayon L. Maxillary sinus floor augmentation using biphasic calcium phosphate: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29(5):1143-8.
12. Barboni B, Mangano C, Valbonetti L, Marruchella G, Berardinelli P, Martelli A, Muttini A, Mauro A, Bedini R, Turriani M, Pecci R, Nardinocchi D, Zizzari VL, Tetè S, Piattelli A, Mattioli M.

- Synthetic Bone Substitute engineered with amniotic epithelial cells enhances bone regeneration after maxillary sinus augmentation. *PLoS One* 2013;8(5):e63256.
13. Giuliani A, Manescu A, Mohammadi S, Mazzoni S, Piattelli A, Mangano F, Iezzi G, Mangano C. Quantitative kinetics evaluation of blocks versus granules of biphasic calcium phosphate *scaffolds* (HA/ β -TCP 30/70) by synchrotron radiation x-ray microtomography: a human study. *Implant Dent* 2016;25(1):6-15.
 14. Soost F. Biocoral--an alternative bone substitute. *Chirurg* 1996;67(11):1193-96.
 15. Yukna RA, Yukna CN. A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (BIOCORAL) bone replacement grafts in infrabony defects. *J Clin Periodontol* 1998;25(12):1036-40
 16. Giuliani A, Manescu A, Larsson E, Tromba G, Luongo G, Piattelli A, Mangano F, Iezzi G, Mangano C. *In vivo* regenerative properties of coralline-derived (biocoral) *scaffold* grafts in human maxillary defects: demonstrative and comparative study with beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate by synchrotron radiation x-ray microtomography. *Clin Implant Dent Relat Res* 2014;16(5):736-50.
 17. Manescu A, Giuliani A, Mohammadi S, Tromba G, Mazzoni S, Diomedea F, Zini N, Piattelli A, Trubiani O. Osteogenic potential of dual-blocks cultured with periodontal ligament stem cells: *in vitro* and synchrotron microtomography study. *J Periodontol Res* 2016;51(1):112-24.
 18. Mazzoni S, Mohammadi S, Tromba G, Diomedea F, Piattelli A, Trubiani O, Giuliani A. Role of cortico-cancellous heterologous bone in human periodontal ligament stem cell *xeno-free* culture studied by Synchrotron radiation phase-contrast microtomography. *Int J Mol Sci* 2017;18(2):364.
 19. Gureyev TE, Mayo SC, Myers DE, Nesterets Ya, Paganin DM, Pogany A, Stevenson AW, Wilkins SW. Refracting Röntgen's rays: propagation-based x-ray phase contrast for biomedical imaging. *J Appl Phys* 2009;105(10):102005.
 20. Komlev VS, Mastrogiacomo M, Peyrin F, Cancedda R, Rustichelli F. X-ray synchrotron radiation pseudo-holotomography as a new imaging technique to investigate angio- and microvasculogenesis with no usage of contrast agents. *Tissue Eng Part C Methods* 2009;15(3):425-30.
 21. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Laino L, D'Aquino R, Tirino V, Papaccio G. Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Transl Med* 2013;2(4):316-324.
 22. Langer M, Cloetens P, Peyrin F. Regularization of phase retrieval with phase-attenuation duality prior for 3D holotomography. *IEEE Trans Image Process* 2010;19(9):2428-36.

SEZIONE 5
Biomateriali, rigenerazione tissutale
e tecnologie innovative in chirurgia maxillofacciale

DISPOSITIVI PER APPLICAZIONI IN CHIRURGIA MAXILLOFACCIALE: DALLA PROGETTAZIONE ALLA REALIZZAZIONE DEI PROTOTIPI MEDIANTE MANIFATTURA ADDITIVA E VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ

Ilaria Campioni
Ingegnere biomedico, Roma

La manifattura additiva – *Additive Manufacturing* (AM) ha trovato negli ultimi anni sempre maggiore applicazione nei contesti sanitari e nell'industria biomedicale sia per l'attraente possibilità di realizzare dispositivi specifici per il paziente, appositamente pensati per adattarsi a distretti anatomici o per specifiche funzioni, sia per altri impieghi attualmente più diffusi, quali l'elaborazione di modelli per pianificazione chirurgica, per finalità informativa per i pazienti e per la formazione del personale medico.

Da un punto di vista economico, l'introduzione della stampa tridimensionale (3D) in senso più ampio ha avuto un grande impatto nel settore medicale.

Le recenti valutazioni di Frost e Sullivan prevedono infatti che il solo mercato globale dei materiali di stampa 3D per il settore sanitario raggiunga 568,5 milioni di dollari entro il 2024, con un tasso annuo di crescita composto (*Compound Annual Growth Rate* – CAGR) impressionante, del 20,3% tra il 2018 e il 2025 (1).

In realtà, quando si parla di stampa 3D e delle tecniche additive, inverse rispetto ai tradizionali metodi sottrattivi, non si fa riferimento a una sola tipologia di processo ma a una serie di tecniche e sistemi di manifattura per la realizzazione di oggetti tridimensionali anche molto diversi tra loro quali quelli a estrusione *Fused Deposition Modeling* (FDM), a base di fotopolimeri liquidi solidificabili – sistemi *PolyJet*, a sinterizzazione laser selettiva (*Selective Laser Sintering*, SLS), solo per citarne alcuni. Inoltre, si fa riferimento a una grande varietà di materiali, polimeri, metalli, ceramici, compositi ecc.

Ciascuna metodologia e ciascun sistema di stampa è caratterizzato da specifici parametri il cui controllo efficace e appropriato determina il buon esito del prodotto finito.

La natura variegata di tali processi implica la necessità di elaborare nuove forme di controllo, verifica e validazione che tengano conto della specificità di ciascuna fase, dalla progettazione fino alla realizzazione ultima, in particolare quando il dispositivo finale si configura come dispositivo medico.

I dispositivi medici realizzati mediante AM, infatti, come quelli realizzati mediante altri metodi di manifattura, devono soddisfare i requisiti di qualità e conformità di fabbricazione nel rispetto di quanto previsto dalle normative e legislazioni vigenti e nelle varie fasi coinvolte.

Nel contesto internazionale statunitense, è stata pubblicata nel 2017 dalla *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) una linea guida (2) contenente indicazioni tecniche per i dispositivi medici realizzati mediante manifattura additiva riguardanti i processi di: design, manifattura, validazione, test e caratterizzazione finale del dispositivo. In particolare, include specifiche sezioni che interessano il software *workflow*, il controllo dei materiali, il *post-processing*, la validazione dei processi e le modalità di test del dispositivo. Tali indicazioni tecniche costituiscono elementi rilevanti nell'ambito della valutazione dei prototipi e dispositivi prodotti mediante AM.

La fase di progettazione, a partire dalla creazione del modello CAD (*Computer Aided Design*), deve essere appositamente pensata per poter essere realizzata mediante sistemi di stampa 3D. Metodologie numeriche computazionali, quali l'analisi a elementi finiti (FEA) possono essere utilizzate a supporto della progettazione, sia per la definizione del corretto design sia per la verifica delle proprietà meccaniche e funzionali (3, 4). Elementi di dettaglio, così come la presenza di fori, superfici piane, specifiche curvature, spessori, devono essere opportunamente determinati tenendo conto dei limiti propri dei sistemi AM.

Il processo di produzione include una serie di variabili che se non adeguatamente definite possono compromettere l'esito finale. La stessa conversione del modello CAD in formati supportati dai sistemi di stampa quali l'STL (*STereoLithography*) può comportare perdite di informazioni. Fattori quali la direzione di stampa, la posizione degli oggetti nel piano, la scelta degli elementi di supporto, i materiali di stampa, i parametri di sistema, così come le condizioni ambientali, possono influire nel processo di produzione e sono stati discussi e presentati con esempi applicativi per diversi sistemi e metodologie AM quali FDM, *PolyJet* e SLS. La durata dell'intero processo di stampa così come le reali proprietà meccaniche dell'oggetto stampato e la qualità finale sono legate alla gestione e al controllo di tali fattori.

Pertanto, la caratterizzazione finale e validazione di quanto progettato e prodotto è necessaria per un potenziale utilizzo reale in ambito medicale. Prototipi realizzati mediante manifattura additiva, quali quelli progettati per applicazioni in chirurgia maxillofacciale, possono avere anche dimensioni e spessori critici per i sistemi additivi (5).

A tal fine, tecniche distruttive e non distruttive permettono di valutare la qualità degli oggetti realizzati. La microtomografia computazionale (micro-CT) solitamente applicata nell'analisi delle strutture ossee e biomateriali (6-10), come tipologia di analisi non distruttiva, trova applicazione anche per la valutazione di manufatti stampati in 3D sia per quanto attiene l'analisi morfologica che per la verifica di accuratezza finale (5). Allo stesso tempo, tecniche distruttive quale l'impiego delle tradizionali prove meccaniche, mantengono l'importante ruolo di permettere la verifica effettiva delle caratteristiche meccaniche finali e nelle fasi precedenti il *post-processing*. Quest'ultimo processo, è rilevante per la qualità finale e la sua verifica è essenziale per i vari aspetti coinvolti quali l'accuratezza, la finitura superficiale, le proprietà meccaniche e la funzionalità.

La lezione ha avuto come obiettivo la presentazione di alcuni elementi caratterizzanti il processo di produzione di prototipi di dispositivi medici mediante l'utilizzo delle tecniche di manifattura additiva, dalla progettazione fino alla realizzazione e relativa verifica, tenendo conto dell'attuale quadro normativo regolatorio in cui tale tipologia di dispositivi sono collocati, sia nel contesto europeo che in quello statunitense. Le principali criticità, inerenti alle diverse tecniche di stampa 3D e AM, sono state evidenziate anche mediante la presentazione di esempi applicativi in particolare nel settore della chirurgia maxillofacciale. Sono state discusse alcune metodologie, tecniche di progettazione e valutazione (CAD, FEA, micro-CT, prove meccaniche sperimentali), con il principale obiettivo di poter effettuare la verifica della qualità dei dispositivi in tutte le fasi del processo produttivo e per la loro validazione, al fine di un possibile impiego per applicazioni mediche.

Bibliografia

1. Frost e Sullivan. *Global 3-D printing materials market for healthcare applications, forecast to 2025*. Rockville, USA: Frost e Sullivan. 2019. Disponibile all'indirizzo: <https://store.frost.com/global-3-d-printing-materials-market-for-healthcare-applications-forecast-to-2025.html>
2. CDRH. *Technical considerations for additive manufactured medical devices—guidance for industry and food and drug administration staff*. Maryland: Food and Drug Administration; 2017.

3. Campioni I, Notarangelo G, Andraeus U, Ventura A, Giacomozzi C. Hip prostheses computational modeling: FEM simulations integrated with fatigue mechanical tests. In: Andraeus U, Iacoviello D. (Ed.). *Biomedical imaging and Computational Modeling in Biomechanics. Lecture Notes in Computational Vision and Biomechanics*, Springer, Dordrecht. 2012;4:81-108.
4. Campioni I, Andraeus U, Ventura A, Giacomozzi C. Hip prostheses computational modeling: Mechanical behavior of a femoral stem associated with different constraint materials and configurations. *Computational Modelling of Objects Represented in Images: Fundamentals, Methods and Applications III—Proceedings of the International Symposium. CompIMAGE. 2012;277-80.*
5. Campioni I, Cacciotti I, Gupta N. Additive manufacturing of reconstruction devices for maxillofacial surgery: design and accuracy assessment of a mandibular plate prototype. *Ann Ist Super Sanità 2020; 56(1):10-18.*
6. Bedini R, Pecci R, Marinozzi F, Bini F, Rizzo, G, Campioni I. Valutazione morfometrica e strutturale dell'architettura del tessuto osseo trabecolare del collo del femore: analisi microtomografica. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2018 (Rapporto ISTISAN 18/7).
7. Campioni I, Pecci R, Pepe E, Bedini R. Metodiche computazionali: studio di fattibilità per l'analisi di strutture osso-biomateriale. In Bedini R, Pecci R, Meleo D, Meli P (Ed.). *2° Convegno Nazionale FORM. Forum On Regenerative Methods. Le metodiche rigenerative nel Servizio Sanitario Nazionale: applicazioni attualmente utilizzate.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015 (ISTISAN Congressi 15/C1). p.7.
8. Bedini R, Pecci R, Meleo D, Campioni I. Bone substitutes scaffold in human bone: comparative evaluation by 3d micro-ct technique. *Applied Sciences 2020;10:345.*
9. Meleo D, Bedini R, Pecci, R, Mangione F, Pacifici L. Microtomographic and morphometric characterization of a bioceramic bone substitute in dental implantology. *Ann Ist Super Sanità 2012; 48(1):59–64.*
10. Campioni I, Pecci R, Bedini R. Ten years of micro-CT in dentistry and maxillofacial surgery: a literature overview. *Applied Sciences 2020;10(12):4328.*

TOMOGRAFIA DI SINCROTRONE BASATA SUL *PHASE-CONTRAST*: UN METODO EMERGENTE PER L'*IMAGING* DELLA MICROVASCOLARIZZAZIONE NELL'OSSO INGEGNERIZZATO DEI DISTRETTI CRANIO FACCIALI

Alessandra Giuliani

Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche, Sezione di Biochimica, Biologia e Fisica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

La rigenerazione di alcuni distretti ossei craniofacciali è oggi una sfida importante dell'ingegneria tissutale. Infatti, poiché l'ossigeno necessario per la sopravvivenza cellulare è in grado di raggiungere una distanza di diffusione massima di circa 150-200 μm dal vettore di vascolarizzazione originale, una ridotta vascolarizzazione spesso ostacola la sopravvivenza a lungo termine dei tessuti rigenerati. Pertanto, la rapida crescita di nuovi vasi sanguigni, capaci di fornire ossigeno e nutrienti anche alle cellule all'interno degli innesti ossei, è condizione necessaria per la loro funzione a lungo termine nella pratica clinica. Sfortunatamente, progressi significativi in questa direzione sono attualmente ostacolati dalla mancanza di metodi efficaci attraverso cui visualizzare in 3D i siti rigenerati.

A questo proposito, negli ultimi anni sta prendendo campo un metodo innovativo per l'*imaging* 3D e l'analisi della microvascolarizzazione e della microstruttura ossea: si basa sull'uso della tomografia a contrasto di fase di sincrotrone. Questa tecnica è in grado di identificare simultaneamente molteplici caratteristiche del tessuto in un sito osseo cranio-facciale (es. la struttura microvascolare e calcificata del tessuto). Inoltre, supera i limiti intrinseci dell'istologia, che permette solo una caratterizzazione 2D, e di approcci tomografici convenzionali, che non risolvono in modo adeguato la rete di vascolarizzazione quando l'agente di contrasto non riesce a penetrare i microvasi di nuova generazione. Infatti, la tomografia a contrasto di fase, essendo basata sulle differenze di fase tra le onde trasmesse da tessuti diversi, è in grado di discriminare tessuti con coefficienti di assorbimento simili (come i vasi e il tessuto osseo). L'approccio qui esaminato si basa sulle esperienze più recenti applicate alla rigenerazione ossea nella regione craniofacciale.

I difetti ossei del distretto craniofacciale, dovuti a condizioni congenite, malattie e lesioni, costituiscono, al giorno d'oggi, un importante problema clinico, spesso risolto con la sostituzione dei tessuti mediante innesto autologo. Tuttavia, a volte questa procedura non è percorribile per morbilità del sito donatore. In questi casi, i protocolli di ingegneria ossea potrebbero supportare il ripristino della funzione tramite sostituzione dei tessuti danneggiati o malati (1).

La funzione a lungo termine dei biomateriali sostitutivi dell'osso dipende fortemente da un'adeguata vascolarizzazione post-innesto; pertanto la ricerca si è recentemente focalizzata su approcci di ingegneria ossea cranio-facciale che coinvolgano l'angiogenesi (2).

Tuttavia, gli attuali metodi di vascolarizzazione spesso non sono sufficientemente rapidi da permettere un'adeguata fornitura di ossigeno fin dalle prime fasi post-innesto: pertanto, è necessario creare reti microvascolari 3D *in vitro*, cioè prima dell'innesto del biomateriale (3).

Ancora oggi comunque, non possediamo una piena comprensione dei percorsi di vascolarizzazione ossea: ciò è principalmente dovuto all'assenza di tecniche di *imaging* idonee a monitorare questi processi *in vivo*. Oggigiorno d'altra parte sono disponibili nuove e interessanti

modalità di *imaging*. Upputuri *et al.* (4) hanno recentemente classificato gli approcci di *imaging* vascolare in tre gruppi: tecniche non ottiche (raggi X, risonanza magnetica, ultrasuoni e *imaging* a emissione di positroni), tecniche ottiche (coerenza ottica, fluorescenza, ecc) e tecniche ibride (*imaging* fotoacustico).

All'interno del gruppo non ottico, i metodi di *imaging* a raggi X risultano certamente i più interessanti. In particolare, la tomografia ad alta risoluzione (micro-CT) (5, 6) è in grado di fornire una risoluzione molto più elevata ($\sim 1 \mu\text{m}$) di *imaging* rispetto all'ecografia ($\sim 30 \mu\text{m}$) e alla risonanza magnetica ($\sim 100 \mu\text{m}$), consentendo la visualizzazione e la quantificazione della microvascolarizzazione. Questa procedura è normalmente ottenuta con l'uso di agenti di contrasto, che sono filler radiopachi e radio densi. Recentemente, è stato dimostrato che il micro-CT a media risoluzione ($\sim 10 \mu\text{m}$) è in grado di riprodurre con successo i vasi sanguigni di medie e grandi dimensioni (7). Langer *et al.* (8) hanno eseguito con successo l'*imaging* della microvascolarizzazione con mezzo di contrasto nell'osso di topo e ratto: pur osservando che alcune parti della rete non erano visibili (a causa dell'effetto di volume parziale), una parte molto grande del volume vascolare è stata ricostruita, grazie all'agente di contrasto.

Negli ultimi anni si è diffuso un nuovo metodo per l'*imaging* 3D e l'analisi combinata della microvascolarizzazione e della microstruttura ossea: si basa sull'utilizzo della microtomografia a contrasto di fase di sincrotrone (PhC-micro-CT) e consente, al contrario delle tradizionali tecniche 2D come l'istologia, di identificare in 3D le caratteristiche dei tessuti senza utilizzare agenti di contrasto. A differenza della micro-CT convenzionale in cui il contrasto è dovuto alle differenze di attenuazione dei raggi X all'interno del campione, nel PhC-micro-CT il contrasto si origina dallo sfasamento dei fotoni X che passano attraverso la materia (9, 10). Questa variazione di fase nei tessuti biologici non mineralizzati può essere tre volte superiore rispetto all'attenuazione del fascio (11, 12), e ciò spiega l'elevato contrasto che è stato osservato tramite PhC-micro-CT nello studio di diversi tessuti biologici.

Sono stati studiati almeno tre metodi di *imaging* a contrasto di fase: la *X-ray grating interferometry* (13, 14), la *diffraction enhanced imaging* (15-18) e la *propagation-based imaging* (9, 19, 20).

I primi due metodi sono spesso utilizzabili solo presso le sorgenti di sincrotrone perché richiedono un raggio di raggi X monocromatico e altamente collimato. Infatti, quando si usa la *X-ray grating interferometry* nelle sorgenti di raggi X convenzionali, si verifica una riduzione del flusso importante. A sua volta, questa riduzione del flusso richiederebbe tempi di esposizione più lunghi rispetto ai sincrotroni, ostacolando, di conseguenza, la traduzione del metodo in contesti clinici (21).

Diversamente dalla *X-ray grating interferometry*, la *diffraction enhanced imaging* sfrutta i vantaggi di una risoluzione angolare di μrad ottenuta mediante il filtraggio di raggi X deflessi per rifrazione. Ciò è reso possibile utilizzando un cristallo analizzatore dopo il campione per selezionare i raggi X rifratti dal campione.

Invece, la *propagation-based imaging* genera contrasto mediante diffrazione di Fresnel o Fraunhofer: il primo si ottiene posizionando il rivelatore e il campione a una distanza moderata.

In pratica, a risoluzioni più basse, l'*imaging* interferometrico a raggi X è l'approccio preferenziale per rivelare strutture poco assorbenti, essendo in grado di percepire anche gradienti di fase più piccoli rispetto ai metodi di *imaging* basati sulla propagazione e sulla diffrazione.

D'altro canto, il metodo di *imaging* basato sulla propagazione è di grande vantaggio nell'*imaging* ad alta risoluzione, perché non sono necessari componenti ottici quando è disponibile una sorgente di raggi X coerente, come nelle strutture di sincrotrone. La possibilità di ottenere alte risoluzioni ha reso l'*imaging* basato sulla propagazione la tecnica di scelta nello studio dell'ultrastruttura e della vascolarizzazione dell'osso umano, con studi preclinici e clinici mirati all'analisi di vasi di medio e piccolo calibro.

Inoltre, l'*imaging* cerebrale è di fondamentale interesse negli studi di plasticità delle malattie cerebrovascolari. Tradizionalmente, nel cervello vengono applicati metodi di micro-CT e microMRI basati sull'assorbimento, utilizzando agenti di contrasto per una migliore visualizzazione della vascolarizzazione. Molto recentemente, il PhC-micro-CT di sincrotrone è stato applicato per visualizzare l'intera microvascolarizzazione del cervello del topo, tramite alta risoluzione ($\sim 3,7 \mu\text{m}$) e senza agenti di contrasto (22). Sono state osservate alterazioni della microcircolazione nel cervello dei topi C57BL/6 ($n = 14$) dopo 14 giorni dall'occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media (tMCAO). La PhC-micro-CT ha dimostrato che il rapporto del raggio di ramificazione (post/pre-occlusione) dei piccoli vasi (raggio $<7,4 \mu\text{m}$) nel gruppo trattato era significativamente inferiore rispetto al gruppo *sham*. Questo risultato ha rivelato il ruolo dell'angiogenesi attiva nel recupero cerebrale dopo l'ictus.

In un altro recente studio, Fratini *et al.* (23) hanno dimostrato che la PhC-micro-CT consente la visualizzazione simultanea della rete micro-vascolare tridimensionale e dei sistemi neuronali del midollo spinale *ex-vivo*. Questo esperimento è stato condotto su scale che vanno da millimetri a centinaia di nanometri e senza agenti di contrasto. Sono state ottenute immagini della distribuzione tridimensionale della micro-rete capillare e delle fibre nervose micrometriche, dei fasci di assoni e del neurone, confermando l'efficacia di questa tecnica anche negli studi preclinici di patologie neurodegenerative e lesioni del midollo spinale.

Come già osservato, la micro-CT convenzionale è una tecnica che consente una buona visualizzazione della struttura dell'osso mineralizzato e dei biomateriali, ma non riesce nel tentativo di distinguere i tessuti molli, anche ad alte risoluzioni. Al contrario, si è visto che la PhC-micro-CT, basata sulla propagazione dei fotoni, presenta, ad alta risoluzione, un contrasto più elevato del tessuto molle, chiaramente in grado di discriminare le strutture legamentose, muscolari, neurali e vascolari.

Queste scoperte hanno portato alcuni studiosi ad analizzare la vascolarizzazione 3D del tessuto osseo ingegnerizzato tramite PhC-micro-CT. Infatti un *imaging* dettagliato e una descrizione quantitativa della rete vascolare è di fondamentale interesse al fine di monitorare la relazione tra formazione dell'osso e vascolarizzazione. In questo contesto, la tomografia di fase ha dimostrato di discriminare in modo efficiente i tessuti con coefficienti di assorbimento simili tramite l'uso di un agente di contrasto (8).

Comunque, sebbene un nuovo mezzo a contrasto di fase–le microbolle–sia stato applicato con successo alle applicazioni angiografiche (24), diversi autori concordano che la PhC-micro-CT è in grado di eseguire una visualizzazione 3D dei capillari più piccoli (23) nei topi, senza l'uso di alcun agente di contrasto.

Questo fatto è stato confermato in un altro recente studio (25), in cui è stata utilizzata la PhC-micro-CT di sincrotrone per visualizzare e analizzare le reti 3D micro-vascolari in costrutti basati sull'osso, costituiti da *scaffold* in ceramica porosa caricati con cellule stromali del midollo osseo (BMSC), in un modello ectopico di topo. I campioni seminati e non seminati con BMSC sono stati confrontati, con o senza l'uso di agenti di contrasto. Gli autori hanno ottenuto la distribuzione 3D di entrambe le reti vascolare e la matrice di collagene e hanno ottenuto informazioni quantitative per i diversi campioni, anche per quelli non marcati.

Esperienze nei distretti craniofacciali

Oggi giorno, l'osso autologo è ancora considerato il materiale di innesto ideale nel distretto craniofacciale (26, 27). Gli innesti autologhi sono vascolarizzati e contengono osteoblasti vitali, matrici organiche e inorganiche e fattori di crescita che consentono il rimodellamento e l'integrazione strutturale con il sito ospite. Tuttavia, vi sono limitazioni significative associate all'uso di innesti autologhi, compresa la disponibilità di tessuto donatore (poiché deve essere

ottenuto intraoralmente), la necessità di ulteriori procedure chirurgiche e, di conseguenza, maggiori tempi e costi operativi (27, 28).

Quando si utilizzano direttamente innesti sintetici e allogenici, solo la periferia dell'innesto viene efficientemente vascolarizzata. Di conseguenza, si verifica frequentemente una zona centrale di necrosi, che si traduce in un guscio di ossificazione in superficie, ma con un basso livello di penetrazione, a causa soprattutto del limitato trasporto di ossigeno (28).

Quindi, una rapida vascolarizzazione degli innesti ossei costituisce un obiettivo clinico di fondamentale importanza. La creazione una vascolarizzazione matura e funzionale non dipende solo dalla migrazione e dalla proliferazione delle cellule endoteliali, ma richiede anche cooperazione e simbiosi tra queste e le cellule perivascolari (28).

Quindi un compito importante è trovare tecniche di *imaging* avanzate che possano verificare e quantificare il processo di mineralizzazione e neovascolarizzazione degli innesti, nelle prime fasi della formazione dell'osso (29).

Le strutture di sincrotrone di terza generazione producono raggi di fotoni X brillanti, con elevate proprietà di coerenza spaziale. È stato dimostrato che sono adatti a diversi studi di ingegneria tissutale, rilevando *in vitro* la matrice extracellulare di recente formazione (30), le prime colonie di cellule endoteliali (31) e le prime fasi di mineralizzazione ossea (32, 33), tramite metodi di *imaging* a raggi X avanzati e basati sul contrasto di fase.

Molto recentemente, alcuni autori (29) hanno dimostrato che le cellule staminali della polpa dentale umana (hDPSC) possono creare un tessuto osseo pronto per essere innestato per l'applicazione clinica. Hanno dimostrato che le hDPSC proliferano *in-vitro*, si differenziano in osteoblasti ed esprimono geni associati a fattori di angiogenesi, come VEGF e PDGFA.

L'*imaging* a contrasto di fase a raggi X basato sul sincrotrone ha dimostrato che, dopo 40 giorni di coltura in terreno standard, le hDPSC formavano osso tessuto (WB), cioè osso fibroso con un basso livello di mineralizzazione. L'analisi di PhC-micro-CT è stata eseguita utilizzando un fascio policromatico, con una distanza da campionario a rivelatore di 150 mm, corrispondente a un *setting* di contrasto di fase su distanza singola. Il potenziale osteogenico del WB fabbricato dopo coltura *in vitro* di hDPSC è stato avallato dai dati quantitativi estratti. Tuttavia, non è stato possibile rilevare alcuna vascolarizzazione utilizzando questa tecnica.

A questo proposito, la tecnica di olografia (*HoloTomography*, HT) ha aggiunto informazioni fondamentali al precedente studio (29). L'approccio olografico differisce dalla PhC-micro-CT basata su una singola distanza in quanto l'acquisizione consiste in scansioni tomografiche a quattro diverse distanze di propagazione, seguite da un diverso algoritmo di ricostruzione. L'analisi HT ha permesso di ottenere una ricostruzione 3D del WB, verificando la presenza di nuovi vasi. Infatti, a causa del loro basso coefficiente di attenuazione, questi nuovi vasi risultano trasparenti nelle ricostruzioni tomografiche convenzionali basate sull'attenuazione. Inoltre, si è visto che il metodo di PhC-micro-CT basato su una singola distanza non è sufficientemente sensibile.

Questo risultato, ottenuto tramite HT, ha confermato con l'*imaging* le deduzioni derivate dal fatto che le hDPSC esprimevano alti livelli di VEGF e PDGF-A. Quest'ultima scoperta è di fondamentale interesse per la fisiologia ossea nei distretti craniofacciali, poiché soddisfa la necessità di neoangiogenesi nel sito ingegnerizzato. Pertanto, questi risultati supportano fortemente la logica che le hDPSC possiedono significative capacità di differenziazione verso l'osteangiogenesi, raggiungendo il *gold standard* di ottenere un osso impiantabile ben vascolarizzato (29).

Inoltre, altri studi (34) hanno dimostrato che le hDPSC si differenziano in osteoblasti e quindi, quando seminate su *scaffold* di collagene di tipo I, contribuiscono efficacemente alla riparazione dei difetti della mandibola umana. In questo contesto, un altro studio (31) ha mostrato, mediante HT di sincrotrone, la stabilità e la qualità dell'osso rigenerato con il metodo suddetto e la qualità

della rete vascolare 3 anni dopo l'innesto. Il tessuto rigenerato nei siti innestati è risultato inaspettatamente essere costituito da osso compatto, quindi strutturalmente diverso e più denso rispetto all'osso alveolare nativo sano dello stesso paziente. Tuttavia, sia nel controllo della mandibola umana sia nelle biopsie mandibolari umane trattate con hDPSC, in accordo con le analisi istologiche, dopo 3 anni l'osso rigenerato risultava ben strutturato e vascolarizzato. Sebbene infatti nel controllo la vascolarizzazione sia risultata più strutturata rispetto alla mandibola umana trattata con hDPSC, densità compatibili con quelle di neo-vasi sono state trovate in diverse aree della biopsia estratta dal sito trattato, confermando *in vivo* che le hDPSC hanno notevoli capacità di differenziazione verso l'osteangiogenesi (31).

In conclusione, mentre la PhC-micro-CT si è dimostrata in grado di visualizzare la rete di vasi in 3D in condizioni *in-vitro* ed *ex-vivo* e senza alcun sezionamento e preparazione del campione, l'uso di sorgenti di raggi X di sincrotrone coerenti e altamente brillanti risulta per ora necessario al fine di raggiungere una qualità dell'immagine superiore e con risoluzione spaziale sub-micrometrica. Infatti, come riportato in letteratura, il rilevamento di microvasi nell'osso ingegnerizzato è stato effettuato principalmente in due modi: mediante micro-CT basata sull'attenuazione, con l'uso di agenti di contrasto o mediante PhC-micro-CT basata sulla propagazione, senza marcatori radiopachi. Tuttavia, l'applicazione dell'ultimo metodo ha richiesto, fino a ora, l'accesso alle strutture di sincrotrone. Questo fatto costituisce una limitazione rilevante per un possibile utilizzo futuro di immagini a contrasto di fase nella pratica clinica, poiché la dose radiogena sarebbe troppo alta per il paziente. Pertanto, al momento si propone il metodo sopra descritto come strumento fondamentale per studi di angiogenesi circoscritti alla ricerca preclinica e negli studi dei siti ossei post-estrattivi dei distretti craniofacciali.

Bibliografia

1. Alsberg E, Hill EE, Mooney DJ. Craniofacial tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(1):64-75.
2. Auger FA, Gibot, L, Lacroix D. The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2013;15:17-200.
3. Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhad J, Ring A, *et al.* Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng*. 2006;12(8):2093-104.
4. Upputuri, PK, Sivasubramanian K, Mark CSK Pramanik M. Recent Developments in vascular imaging techniques in tissue engineering and regenerative medicine. *BioMed Research International* 2015;783983.
5. Barbetta A, Bedini R, Pecci R, Dentini M. Role of X-ray microtomography in tissue engineering. *Ann Ist Super Sanita* 2012;48(1):10-18.
6. Arkudas AJ, Beier P, Prymachuk G, Hoereth T, Bleiziffer O, Polykandriotis E, *et al.* Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2010;16(6):1503-14.
7. Nebuloni L, Kuhn GA, Vogel J Muller R. A novel *in vivo* vascular imaging approach for hierarchical quantification of vasculature using contrast enhanced micro-computed tomography. *PLoS ONE* 2014; 9(1):e86562.
8. Langer M, Prisby R, Peter Z, Boistel R, Lafage-Proust MH, Peyrin F. Quantitative investigation of bone microvascularization from 3D synchrotron micro-computed tomography in a rat model. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2009;1004-7.
9. Snigirev S, Snigireva I, Kohn V, Kuznetsov S, Schelokov I. On the possibilities of X-ray phase contrast micro imaging by coherent high-energy synchrotron radiation. *Rev Sc. Instrum*. 1995; 66:5486-92.

10. Bravin A, Coan P, Suortti P. X-ray phase-contrast imaging: from pre-clinical applications towards clinics. *Phys. Med. Biol* 2013;58(1):R1-R35.
11. Momose A. Demonstration of phase-contrast X-ray computed tomography using an x-ray interferometer. *Nucl Instrum and Methods* 1995;A352:622-28.
12. Lewis RA, Hall CJ, Hufton AP, Evans S, Menk RH, Arfelli F, *et al.* X-ray refraction effects: application to the imaging of biological tissues. *Brit J Radiol* 2003;76(905):301-8.
13. Momose A, Takeda T, Itai Y, Hirano K. Phase-contrast X-ray computed tomography for observing biological soft tissues. *Nat Med* 1996;(2):473-5.
14. Momose A. Phase-sensitive imaging and phase tomography using X-ray interferometers. *Opt Express* 2003;11(19):2303-14.
15. Davis TJ, Gao D, Gureyev TE, Stevenson AW, Wilkins SW. Phase-contrast imaging of weakly absorbing materials using hard X-rays. *Nature* 1995;373:595-98.
16. Ingal, IV, Beliaevskay EA. X-ray plane-wave topography observation of the phase contrast from a non-crystalline object. *J Phys D: Appl. Phys* 1995;28:2314-17.
17. Chapman D, Thomlinson W, Johnston RE, Washburn D, Pisano E, Gmür N, *et al.* Diffraction enhanced X-ray imaging. *Phys Med Biol* 1997;42:2015-25.
18. Chapman D, Pisano E, Thomlinson W, Zhong Z, Johnston RE, Washburn D, *et al.* Medical applications of diffraction enhanced imaging. *Breast Dis* 1998;10(3-4):197-207.
19. Wilkins SW, Gureyev TE, Gao D, Pogany A, Stevenson AW. Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays. *Nature* 1996;384:335-38.
20. Cloetens P, Luding W, Baruchel J, Van Dyck D, Van Landuyt J, Guigay JP, *et al.* Holotomography: quantitative phase tomography with micrometer resolution using hard synchrotron radiation x rays. *Appl Phys Lett* 1999;75:2912.
21. Nesch I, Fogarty DP, Tzvetkov T, Reinhart B, Walus AC, Khelashvili G, *et al.* The design and application of an in-laboratory diffraction-enhanced x-ray imaging instrument. *Rev Sci Instrum* 2009; 80:093702.
22. Miao P, Wu Z, Li M, Ji Y, Xie B, Lin X, *et al.* Synchrotron radiation X-ray phase-contrast tomography visualizes microvasculature changes in mice brains after ischemic injury. *Neural Plast* 2016; 3258494.
23. Fratini M, Bukreeva I, Campi G, Brun F, Tromba G, Modregger P, *et al.* Simultaneous submicrometric 3D imaging of the micro-vascular network and the neuronal system in a mouse spinal cord. *Sci Rep* 2015;5:8514.
24. Tang R, Xi Y, Chai WM, Wang Y, Guan Y, Yang GY, *et al.* Microbubble-based synchrotron radiation phase contrast imaging: basic study and angiography applications. *Phys Med Biol* 2011;56:3503-12.
25. Bukreeva I, Fratini M, Campi G, Pelliccia D, Spanò R, Tromba G, *et al.* High-resolution X-ray techniques as new tool to investigate the 3D vascularization of engineered-bone tissue. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;3:133.
26. Yamanichi N, Itose T, Neiva R, Wang HL. Long-term evaluation of implant survival in augmented sinuses: A case series. *Int. J. Periodontics Restorative Dent* 2008;28(2):163-169.
27. Iezzi G, Piatelli A, Giuliani A, Mangano C, Barone A, Manzon L, *et al.* Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of bone grafting materials and membranes during maxillary sinus-lift procedures. Part 2: detailed characteristics of the materials. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18(1):33-44.
28. Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA, Redondo PA, Hart AR, O' Doherty E *et al.* Engineered vascularized bone grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(8):3311-6.

29. Paino F, La Noce M, Giuliani A, De Rosa A, Mazzoni S, Laino L *et al.* Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: a new tool in bone tissue engineering. *Clin Sci (Lond)* 2017;131(8):699-713.
30. Albertini G, Giuliani A, Komlev V, Moroncini F, Pughaloni A, Pennesi G *et al.* Organization of extracellular matrix fibers within polyglycolic acid-polylactic acid *scaffolds* analyzed using X-ray synchrotron-radiation phase-contrast micro computed tomography. *Tissue Eng. Part C Methods* 2009; 15:403-11.
31. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F *et al.* Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line HT revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Translational Medicine* 2013;2:316-24.
32. Manescu A, Giuliani A, Mazzoni S, Mohammadi S, Tromba G, Diomede F *et al.* Osteogenic potential of dual-blocks cultured with periodontal ligament stem cells: in-vitro and synchrotron microtomography study. *J Periodontal Res* 2016;51(1):112-24.
33. Mazzoni S, Mohammadi S, Tromba G, Diomede F, Piattelli A, Trubiani O *et al.* Role of cortico-cancellous heterologous bone in human periodontal ligament stem cell *xeno-free* culture studied by Synchrotron radiation phase-contrast microtomography. *Int J Mol Sci* 2017;18(2):364.
34. D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A *et al.* Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater* 2009;18:75-83.

PRODOTTI *CUSTOM-MADE* REALIZZATI CON PROCESSI INNOVATIVI IN CHIRURGIA RIGENERATIVA E RICOSTRUTTIVA DELLA REGIONE MAXILLO-FACCIALE

Marco Tatullo

Tecnologica Research Institute, Biomedical Section, Crotona

L'invecchiamento della popolazione ha portato a un incremento dell'incidenza di traumi e difetti ossei dovuti a fratture, tumori e infezioni. Pertanto, la medicina rigenerativa e la implantologia protesica hanno sempre maggiormente implementato le proprie tecnologie con applicazione clinica. Queste necessità cliniche, spesso complesse, hanno reso necessaria la ricerca di soluzioni biomimetiche e altamente performanti. Nasce così l'idea dei Biomateriali.

Si definiscono i biomateriali come: "materiali sintetici progettati per un uso prolungato a contatto con i mezzi biologici, che minimizzano le eventuali reazioni avverse da parte dell'organismo" (1).

I biomateriali sono dunque tutti quei materiali specificatamente progettati o utilizzati in applicazioni biomediche e che costituiscono i componenti delle protesi. La necessità di utilizzare protesi per riparare o sostituire parti del corpo umano esiste fin dall'antichità: all'interno di numerosi scavi etruschi sono state trovate, per esempio, protesi dentarie in metallo; risalgono, invece, all'antico Egitto esempi di protesi di legno e pelle che riproducono alluci artificiali.

La storia dei biomateriali, dal 1950, può essere riassunta in tre tappe fondamentali:

- Biomateriali di prima generazione: la caratteristica fondamentale del materiale è di essere bioinerte, ovvero di minimizzare le interazioni chimico/fisiche tra organismo e materiale.
- Biomateriali di seconda generazione: il materiale deve essere bioattivo, ovvero si deve integrare velocemente con l'organismo provocando azioni e reazioni controllate nell'ambiente fisiologico, o riassorbibile, se viene gradualmente degradato nell'organismo, senza causare problemi di rigetto o tossicità.
- Biomateriali di terza generazione: il materiale deve essere sia bioattivo che riassorbibile; rappresentano il presente e il futuro dei biomateriali. I biomateriali di terza generazione sono definiti materiali biomimetici, in quanto interagiscono con i tessuti adiacenti attraverso meccanismi di riconoscimento biomolecolare (2).

Il termine "biomimetica" deriva dalle parole greche "*bios*" (vita) e "*mimesis*" (da imitare). La biomimetica, perciò, si occupa dello studio dei fenomeni naturali per comprenderne i meccanismi e applicarli alla scienza, all'ingegneria e alla medicina. Lo sviluppo di biomateriali innovativi consente una modulazione a livello molecolare e del legame con le cellule. Una superficie modificata, ovvero biomimetica, può rappresentare una sorta di matrice extracellulare artificiale in grado di fornire gli stimoli biologici adatti a guidare la formazione di nuovo tessuto (3).

L'evoluzione nella ricerca merceologica nel campo dei biomateriali è giustificata dalla necessità di ritrovare materiali che asseriscano in maniera maggiore ai criteri di osteoconduzione, osteoinduzione e osteogenesi. Questi tre principi sono elementi essenziali per la rigenerazione ossea e hanno dei significati funzionali differenti:

- osteoconduzione: fa riferimento alla facilitazione e orientamento del coagulo con conseguente creazione di un nuovo sistema Haversiano sulla base dello *scaffold* ricreato;

- osteoinduzione: fa riferimento alla stimolazione e attivazione delle cellule staminali dell'ospite presenti nel tessuto osseo circostante in modo da condurle a una differenziazione in osteoblasti;
- osteogenesi: fa riferimento al potenziale di proliferazione e di osteosintesi diretta delle cellule osteoprogenitrici presenti nell'innesto e che sopravvivono al trapianto.

Tutti i biomateriali hanno la capacità di osteoconduzione, riuscendo quindi a fungere da "impalcatura" o "scaffold" durante il processo di guarigione ossea; alcuni di essi sono strutturati con lo scopo preciso di poter convogliare anche una minima osteoinduzione. Nonostante ciò allo stato attuale si evince che non esiste un biomateriale ideale, tuttavia l'utilizzo di questi ultimi è ampiamente giustificato da una maggiore semplicità d'impiego e una minore incidenza di complicanze, nonché una maggiore accettazione da parte del paziente.

Gli scaffold possono essere costituiti da materiali naturali o di sintesi, all'interno dei quali possono essere presenti elementi come il calcio e il fosfato, componenti minerali fisiologici dell'osso.

I materiali di sintesi hanno il vantaggio di avere caratteristiche manipolabili e migliorabili durante il processo di creazione: in tal senso si ottengono materiali che hanno un'ottima capacità di osteoconduzione, un'ottima biocompatibilità e una resistenza adeguata in modo tale da fornire un modulo di elasticità simile a quello osseo. Lo svantaggio principale è la scarsa previsione del riassorbimento e dei suoi tempi assieme a una capacità di manipolazione non sempre ottimale.

I materiali di sintesi vengono progettati in modo da riassumere molte delle caratteristiche necessarie allo svolgimento della funzione di sostituti ossei. I poliesteri alifatici sono i polimeri più usati, mentre i materiali metallici risultano particolarmente adatti alla costruzione di strutture capaci di sopportare carichi senza il rischio di grandi deformazioni elastiche, per questo sono adatti alla sostituzione di tessuti duri come ossa e denti (4).

Caratteristica peculiare dei biomateriali è senza dubbio quella di essere biocompatibili.

Esistono varie sottocategorie di materiali biocompatibili. Questi possono essere classificati sulla base degli effetti prodotti sul materiale stesso in seguito all'innesto: da qui la distinzione tra biostabili e biodegradabili. Oppure sulla base dell'interazione materiale-organismo: da qui le definizioni di biotossici, bioattivi, bioinerti, biorisorbibili. Infine, sulla base della natura chimica: polimerici, metallici, ceramici, compositi, biologici. Sono definiti biostabili i materiali che, impiantati, non subiscono sostanziali trasformazioni chimiche o fisiche nel tempo; al contrario sono biodegradabili i materiali che, impiantati, subiscono trasformazioni. Sono biotossici i materiali che provocano reazioni avverse dell'organismo, contenenti elementi quali nichel, cadmio, vanadio, alcuni acciai, carburi, metil-metacrilati. Sono bioinerti i materiali stabili dal punto chimico-fisico, non tossici e che presentano interazioni minime con l'ambiente biologico, permettendo una buona coesistenza tra impianto e organismo, pur rivestendosi di tessuto cicatriziale. Infatti, nessun materiale è completamente inerte a contatto col corpo umano. Ne sono esempi il tantalio, titanio, alluminio, zirconio, polietilene ad alto peso molecolare, acciaio. Sono biorisorbibili i materiali costituiti solo da sostanze che possono essere metabolizzate dall'organismo, che quindi dissolvono in presenza dei fluidi corporei e i cui prodotti di dissoluzione vengono espulsi tramite i reni. Tra questi si hanno l'Acido Poliglicolico (*PolyGlicolic Acid*, PGA), l'Acido Polilattico, loro copolimeri (PLGA), alcuni bioceramici come i fosfati di calcio e i biovetri (5).

I campi in cui in cui questi trovano maggiore applicazione sono:

- Ortopedia: le protesi articolari (ginocchio, anca, etc.), il cemento osseo, la sostituzione di legamenti, la fissazione interna ed esterna.
- Odontostomatologia: i cementi, le amalgame, i materiali da impronta, i materiali ortodontici, gli impianti ossei.

- Chirurgia cardiovascolare: le valvole cardiache, le protesi vascolari di grande e medio calibro, stimolatori cardiaci, *stents*.
- Chirurgia plastica: gli espansori cutanei.
- Oculistica: le lenti a contatto, i cristallini artificiali, il silicone nel trattamento dei distacchi di retina, gli impianti corneali e le cornee artificiali, le lenti intraoculari.
- Chirurgia generale (suture e cateteri), neurochirurgia, controllo del concepimento, dispensazione di farmaci, adesivi e sigillanti (tessutali), impianti cocleari, pelle artificiale.

Tra i polimeri sintetici la classe più interessante dal punto di vista della biodegradabilità è quella dei poliesteri. Questi polimeri biodegradabili contengono tutti nella loro struttura legami esterei idrolizzabili ciò significa che il processo degradativo prevede la rottura del legame a opera dell'acqua. Per questi polimeri si parla perciò di degradazione idrolitica.

I materiali polimerici sintetici e biocompatibili più utilizzati per la produzione di *scaffold* sono:

- acido polilattico (*Polylactic Acid*, PLA);
- acido policaprolattone (*PolyCaprolactone*, PLC);
- acido polilattico-co-glicolico (*Poly Lactic-co-Glycolic Acid*, PLGA).

Questi interagiscono in maniera positiva con le cellule.

Il PLA è un polimero termoplastico che può essere utilizzato come nuovo materiale nella produzione additiva. Uno studio condotto nel 2018 dimostra come questo materiale sia altamente biocompatibile e relativamente non invasivo. Caratterizzando chips di osso composito per fissazione interna in PLA, PLA/idrossiapatite (HA) e PLA/HA/Silk in 3D, all'interno di una frattura femorale si è dimostrato come il chip di osso composito di PLA/HA/Silk ha portato a una formazione precoce di un osteoide attiva con una deposizione di osteoblasti (6).

L'acido PLGA è α -idrossiestere, ossia poliestere ottenuto dalla polimerizzazione di α -idrossiacidi. È composto biocompatibile e biodegradabile i cui prodotti di degradazione (dovuti a idrolisi non enzimatica dei legami esteri in ambiente fisiologico) sono composti a basso peso molecolare, quali acido lattico e acido glicolico, che rientrano nei normali percorsi metabolici, infatti vengono normalmente espulsi dall'organismo sotto forma di biossido di carbonio e acqua. Inoltre, il PLGA presenta un ampio *range* di velocità di degradazione, da giorni ad anni, a seconda del rapporto dei due monomeri e/o del peso molecolare.

Il PLGA è uno dei polimeri sintetici più utilizzati per lo sviluppo di sistemi di farmaci e biomolecole terapeutiche e come componente delle applicazioni di ingegneria tissutale. La sua biodegradabilità e la sua biocompatibilità nonché versatilità gli permettono di essere un polimero di riferimento nella produzione di nano e microparticelle, di incapsulare e fornire un'ampia varietà di molecole idrofile e idrofobiche. Stimola la proteina morfogenetica ossea-2 (BMP2), fattori di crescita più diffusa nell'ingegneria del tessuto osseo, ma anche il fattore di crescita delle piastrine (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) (7).

Le membrane in PLGA vengono utilizzate clinicamente per la rigenerazione guidata dei tessuti (*Guided Tissue Regeneration*, GTR) fornendo dei risultati ottimali senza invasione epiteliale o complicanze gravi di infezione (8).

Il PCL è un poliestere lineare alifatico semicristallino e idrofobo con cinetiche di degradazione molto lente causati da un forte carattere idrofobico e da un'elevata cristallinità. Pertanto, è indicato come materiale base per lo sviluppo d'impianti a lungo termine. I polimeri basati sul PCL hanno mostrato buone interazioni con gli osteoblasti e gli *scaffold* da essi costituiti sono capaci di promuovere la crescita degli osteoblasti e il mantenimento del loro fenotipo. La degradazione del PCL rilascia acido ϵ -idrossicaproico quale unico metabolita e avviene in due fasi:

- idrolisi non enzimatica in massa del legame estereo;
- frammentazione e rilascio delle specie oligomeriche.

I frammenti di PCL sono degradati da macrofagi e da cellule giganti in un processo che coinvolge anche enzimi prodotti dai lisosomi. Esperimenti *in vitro* hanno evidenziato, inoltre, come la degradazione del PCL sia accelerata dall'attività enzimatica e microbica (9).

Uno studio su modello canino di difetto osseo alveolare, in cui i difetti sono stati coperti con membrane differenti una in PCL, e membrane in collagene normalmente utilizzate nella pratica clinica, ha mostrato come l'utilizzo del PLC unito al β -TCP ha migliori proprietà fisiche, biologiche e meccaniche rispetto alla sola membrana di collagene che in condizioni di umidità ha proprietà meccaniche ridotte (10).

L'*Additive Manufacturing* (AM) è una tecnica di produzione additiva industriale che consente di convertire un modello digitale 3D in un modello clinico solido, stampandolo strato su strato. Attualmente la tecnica AM fornisce una soluzione per la produzione di costrutti biodegradabili offrendo un metodo di personalizzazione dei dispositivi chirurgici che migliora i risultati del paziente portato inoltre a una riduzione dei tempi operatori e aumentato la precisione chirurgica.

L'AM è un processo suddiviso in quattro fasi fondamentali:

- *imaging* ovvero l'acquisizione delle immagini tramite tomografia computerizzata a fascio conico CBTC;
- elaborazione di immagini ovvero la conversione delle immagini CBTC in modelli di superficie 3D;
- *progettazione assistita da computer* (CAD);
- *produzione additiva vera e propria* (11).

A seconda del principio di fabbricazione, le tecniche AM per la produzione degli *scaffold* sono convenzionalmente classificate in:

- *Selective Laser Sintering* (SLS);
- *StereoLithography Apparatus* (SLA);
- *Fused Deposition Modelling* (FDM);
- *Three-Dimensional Printing* (3DP);
- *Solution/slurry extrusion-based techniques*;
- *Tissue and organ printing techniques*.

Questa vasta gamma di tecnologie di produzione additiva è in grado di applicarsi a diversi tipi di materiali polimerici quali plastiche, resine e biopolimeri che vengono lavorati per ottenere *scaffold* ottimali (12).

La SLS prevede che una soluzione in polvere è selettivamente sinterizzata utilizzando un raggio laser ad alta intensità e dopo la generazione di uno strato, un nuovo letto in polvere viene distribuito meccanicamente da un rullo. *Scaffold* fabbricati utilizzando il processo SLS con diverse miscele di poliammide e idrossiapatite sono stati valutati sulla base di test meccanici per la sua resistenza e mediante studi *in vitro* con linee di osteosarcoma umane per studi di crescita cellulare. I test meccanici testimoniano buone proprietà fisiche. I test *in vitro* mostrano una buona crescita cellulare. L'idoneità degli *scaffold* porosi per la riparazione ossea viene inoltre assicurata mediante l'analisi degli elementi finiti di un femore umano in varie attività fisiche.

La SLA è una tecnica mediante la quale strati di un polimero fotosensibile vengono polimerizzati selettivamente da una luce laser o UV; Il laser solidifica la resina in funzione della sezione del pezzo da realizzare, si abbassa la piattaforma sulla quale è vincolato il pezzo in costruzione. Uno studio condotto nel 2017 riporta per il miglioramento dell'osteoinduzione dei biomateriali compositi, con macro-architettura controllata e distribuzione su microscala di particelle di idrossiapatite, prodotte mediante stereolitografia. In questo processo, le particelle di idrossiapatite non sono solo incorporate in una matrice polimerica erodibile, ma concentrate sulla superficie delle strutture. Ciò porta a una solida formazione ossea *in vivo* a bassa concentrazione

di idrossiapatite. L'architettura composita 3D riportata fornisce opportunità significative per lo sviluppo di biomateriali funzionali per la riparazione ossea e l'ingegneria tissutale (13).

La tecnica FDM prevede che il filamento polimerico immesso viene estruso attraverso un ugello riscaldato e il fuso polimerico viene depositato continuamente su una piattaforma di costruzione per costruire lo *scaffold* strato per strato. *Scaffold* composti da poli (3-idrossibutirato-co-3-idrossivalerato)/calcio solfato emiidrato, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/calcium sulfate hemihydrate (PHBV/CaSH), e stampati 3D usando la tecnica di modellazione con deposizione fusa (FDM), hanno promosso la nuova formazione ossea *in vitro* e *in vivo*. Pertanto, l'integrazione dello *scaffold* PHBV/CaSH stampato in 3D e di *hydrogel* CS rappresenta una nuova strategia per promuovere la proprietà dell'osteogenesi, mostrando pieno potenziale per la riparazione dei difetti ossei.

La tecnica 3DP, mediante una testina a getto, prevede che un materiale legante viene posato selettivamente su uno strato di polvere, successivamente un nuovo strato di polvere viene posta sopra a quella precedente e il processo di deposizione ciclica ricomincia. Attraverso stampanti 3D sono stati prodotti *scaffold* di PLA con dimensioni di pori variabili al fine di valutare la l'attaccamento e la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano. Dallo studio condotto emerge che le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano aderiscono alle superfici degli *scaffold* e mostrano una buona capacità proliferativa pertanto, gli *scaffold* di PLA stampati in 3D appaiono come buoni candidati per la riparazione e la rigenerazione ossea (14).

I progressi svolti nell'ambito dell'ingegneria tissutale stanno portando allo sviluppo di nuovi *scaffold* utili per la rigenerazione delle ossa e quindi potenzialmente validi per le applicazioni in chirurgia maxillo-facciale.

A tal proposito nasce l'idea del progetto Zeusi, acronimo di *customiZEd prodUcts applied to innovative proceSses in regenerative and reconstructive surgery of maxillofacial region* ovvero nuovi prodotti *custom-made* applicati a processi innovativi utilizzati nella chirurgia rigenerativa e ricostruttiva della regione maxillo-facciale.

Il progetto Zeusi è stato descritto nella lezione, e riguarda la innovativa modalità con cui si ridisegna la chirurgia ricostruttiva *custom-made* e la diagnostica avanzata predittiva. Il progetto ha come obiettivo lo sviluppo di nuovi prodotti protesici con l'utilizzo di nuovi materiali e di materiali tradizionali e sistemi software integrati in grado di implementare un processo innovativo finalizzato a una chirurgia ricostruttiva protesicamente-guidata e altamente customizzata. Il progetto inoltre, ha come fine ultimo l'idea di realizzare nuovi processi innovativi nella chirurgia maxillo-facciale.

Questo nuovo protocollo di pianificazione dell'intervento è stato applicato su preliminari trattamenti chirurgici effettuato su pazienti complessi. L'utilizzo di tecniche di *imaging* e successiva *post-processing* con analisi dei dati ha permesso di valutare la morfologia e le dimensioni della lesione, e di procedere in seguito con l'operazione senza ampliare la zona chirurgica e riducendo i tempi operatori, producendo un tangibile beneficio al paziente e un risparmio sui costi generali. Questo modello operativo si iscrive nel generale quadro di innovazione di processo che sta caratterizzando la medicina protesica in ambito oro-maxillo-facciale.

Bibliografia

1. Di Bello C. *Biomateriali-introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*. Bologna: Patron Editore; 2004.
2. Di Bello C, Bagno A. *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Bologna: Patron Editore; 2009.

3. Reddy R, Reddy N. Biomimetic approaches for tissue engineering. *J Biomater Sci Polym* 2018;29(14):1667-85.
4. De Witte TM, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA, Peppas NA. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regen Biomater* 2018;5(4):197-211.
5. Jones JR, Hench LL. Biomedical Materials for new millennium: perspective on the future. *Mater Sci Tech* 2011;11(8):891-900.
6. Yeon YK. New concept of 3D printed bone clip (polylactic acid/hydroxyapatite/silk composite) for internal fixation of bone fractures. *J Biomater Sci Polym* 2018; 29(7-9):894-906.
7. Oller I, Padial-Molina M, Galindo P, O'Valle F, Jódar-Reyes AB, M.Peula-García J. Bone regeneration from PLGA micro-nanoparticles. *BioMed Research* 2015:415289.
8. Kawasaki T, Ohba S, Nakatani Y, Asahina I. Clinical study of guided bone regeneration with resorbable polylactide-co-glycolide acid membrane. *Odontology* 2018;106(3):334-39.
9. Lam CX, Hutmacher DW, Schantz JT, Woodruff MA and Teoh SH: Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 month *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Mater Res* 2009;90:906-19.
10. Barbeck M, Hoffmann C, Sader R, Peters F, Hübner WD, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. Injectable bone substitute based on β -TCP Combined with a hyaluronan-containing hydrogel contributes to regeneration of a critical bone size defect towards restitutio ad integrum. *J Oral Implantol* 2016;42(2):127-37.
11. Bibb R, Eggbeer D, Paterson A. *medical modelling. The application of advanced design and rapid prototyping techniques in medicine*. Oxford: Elsevier LTD; 2015.
12. Mota C, Puppi D, Chiellini F, Chiellini E. Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9(3):174-90.
13. Guillaume O. Surface-enrichment with hydroxyapatite nanoparticles in stereolithography-fabricated composite polymer scaffolds promotes bone repair. *Acta Biomater* 2017;54:386-98.
14. Velioglu ZB. 3D-printed poly(lactic acid) scaffolds for trabecular bone repair and regeneration: scaffold and native bone characterization. *Connect Tissue Res* 2018;30:1-9.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2020, 4° Suppl.*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, dicembre 2020