

## MATERIALI DA INNESTO

I materiali da innesto svolgono diversi compiti negli interventi di rigenerazione ossea:

- Mantengono lo spazio agendo come impalcatura per la crescita ossea interstiziale a partenza dal sito ricevente
- Stimolano la neoformazione ossea dal sito ricevente
- forniscono uno scudo meccanico contro la pressione dei tessuti molli sovrastanti
- proteggono il volume aumentato dal riassorbimento.

Le indicazioni cliniche vanno dai piccoli difetti peri-implantari alla rigenerazione ossea di difetti di ampia dimensione. Considerando questa ampia gamma di indicazioni, è evidente che un solo materiale non può soddisfare tutte le esigenze, pertanto a volte è necessario combinare due o più materiali per ottenere un risultato clinico prevedibile. I materiali da innesto possono essere ricavati dal paziente stesso (autoinnesti) o da fonte esterna. La tabella 2 mostra uno schema di classificazioni dei vari materiali



Tab. 2: Materiali da innesto

Indipendentemente dalla loro origine e produzione, il materiale da innesto deve soddisfare determinati requisiti e caratteristiche quali essere sicuri e biocompatibili, per evitare il rischio di trasmettere malattie o scatenare reazioni immunitarie che possono provocare la non incorporazione dell'innesto. Questo problema non sussiste per gli autoinnesti a meno che questi non vengano manipolati in modo improprio durante l'intervento. La geometria dovrebbe favorire la crescita dei vasi sanguigni all'interno della massa del materiale che quindi non solo deve essere poroso ma deve anche presentare dei macropori interconnessi<sup>99</sup> ci sono dati contrastanti per quanto riguarda la dimensione ottimale dei macropori ma ci sono evidenze che una dimensione ottimale compresa tra 100 e 500 micron<sup>100</sup>. Questa microporosità è fondamentale per la rivascolarizzazione degli innesti sotto forma di blocchi infatti quando si utilizzano innesti ossei particolati è più probabile che si

formino dei vasi tra le varie particelle dell'innesto. E' quindi importante non compattare eccessivamente il materiale per facilitare la rivascularizzazione. Le caratteristiche di superficie dei materiali sostitutivi dell'osso come la composizione chimica, microporosità, macroporosità superficiale, cristallinità sono fondamentali per l'adsorbimento iniziale delle proteine, l'adesione degli osteoblasti, la deposizione di osteoide e in ultima analisi la formazione di osso a diretto contatto con la superficie del materiale (osteoconduttività). Una importante caratteristica da tener conto è la riassorbibilità dei questi materiali: se il materiale viene utilizzato in futuri siti implantari, come ad esempio alveoli post-estrattivi il materiale dovrebbe idealmente essere preferibilmente riassorbito e sostituito totalmente da osso vitale neoformato senza interferenza di residui di materiale nella compagine del sito innestato. Ci sono materiali che si riassorbono molto velocemente e garantiscono una veloce loro sostituzione con osso ma che mantengono poco il volume, altri che non si riassorbono rimanendo come un amalgama nella compagine del volume dell'osso rigenerato ma che nel contempo mantengono il volume osseo ottenuto in maniera o più stabile. A volte la combinazione di più materiali porta a risultati ottimali tra neoformazione di osso e stabilità volumetrica.

#### **INNESTI OSSO AUTOLOGO**

Costituiscono il gold standard ed il riferimento di tutti gli altri materiali per le spiccate capacità osteogenetiche ed osteoinduttive oltre che chiaramente quelle osteoconduttive. Con l'innesto di osso autologo fattori di crescita e cellule osteogenetiche vengono portate nel sito ricevente. La quantità e la concentrazione di fattori di crescita possono mostrare grandi variabilità individuale ed intraindividuale che dipende dall'età del paziente, dalla presenza di malattie sistemiche, ed infine dal sito donatore. I fattori di crescita comprendono le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs), il transforming growth factor-beta, il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF), tutti presenti all'interno della matrice ossea e rilasciati durante il riassorbimento dell'innesto. Maggiore è l'area di superficie assoluta dell'autoinnesto, più velocemente vengono rilasciati i fattori di crescita. Ciò significa che i blocchi di osso spongioso rilasciano più facilmente i fattori di crescita rispetto all'osso compatto e che gli autoinnesti particolati mostrano un rilascio superiore e più veloce di fattori stimolanti di quanto non facciano gli innesti a blocco<sup>101</sup>. Le cellule presenti nel tessuto osseo sono rappresentate da osteoblasti, osteociti, osteoclasti e da cellule di rivestimento (periostali ma soprattutto endostali) ma quelle che rivestono un primario interesse per la rigenerazione ossea sono le cellule osteogenetiche cioè osteoblasti, pre-osteoblasti e cellule staminali

pluripotenti. Queste cellule sono certamente più numerose nell'osso trasecolare, mentre l'osso compatto presenta un numero esiguo di cellule osteogenetiche <sup>100</sup>. Il potenziale osteogenetico inoltre è maggiore nei soggetti giovani e sani rispetto ai pazienti anziani per la ridotta capacità proliferativi delle cellule osteoprogenitrici piuttosto che per la funzione compromessa degli osteoblasti presenti <sup>102</sup>. Le sedi di prelievo possono essere distinte in intraorali (sinfisi, ramo mandibolare, tuber maxillae, selle edentule, processo zigomatico, spina nasale, esostosi) ed extra-orali (cresta iliaca, calvaria, tibia).



**Fig. 42: Particolato di osso autogeno**

### **INNESTI PARTICOLATI**

Gli innesti particolati (Fig. 42) hanno potenzialmente capacità ostoinduttive ed osteoconduttive molto maggiori di quanto non facciano gli innesti a blocco poiché la superficie dell'innesto che presenta fattori di crescita esposti è molto più ampia. Inoltre un innesto particolato si rivascularizza molto prima di un innesto a blocco soprattutto se corticale. Se il potenziale osteogenetico aumenta nell'osso particolato, in realtà la quota totale delle cellule osteogenetiche può diminuire a causa della manipolazione meccanica dell'innesto <sup>103</sup>. Ciò significa che il numero delle cellule è maggiore in un blocco cortico-midollare prelevato dalla cresta iliaca rispetto al materiale particolato risultante dalla triturazione dello stesso blocco in un tritaosso. In più se i blocchi vengono triturati perdono la possibilità di essere fissati, diminuendo così la stabilità meccanica dell'innesto essendo più indicati per il riempimento di cavità e difetti ossei auto-contenitivi. Inoltre aumenta il tasso di riassorbimento del volume totale innestato durante l'attecchimento. Un vasto numero di prove scientifiche in letteratura documenta l'idoneità degli autoinnesti particolati per interventi rigenerativi in cui sia necessario un potenziale osteogenetico ed osteoinduttivo rendendoli superiori a qualsiasi altro sostituto osseo presente sul mercato <sup>104</sup>.

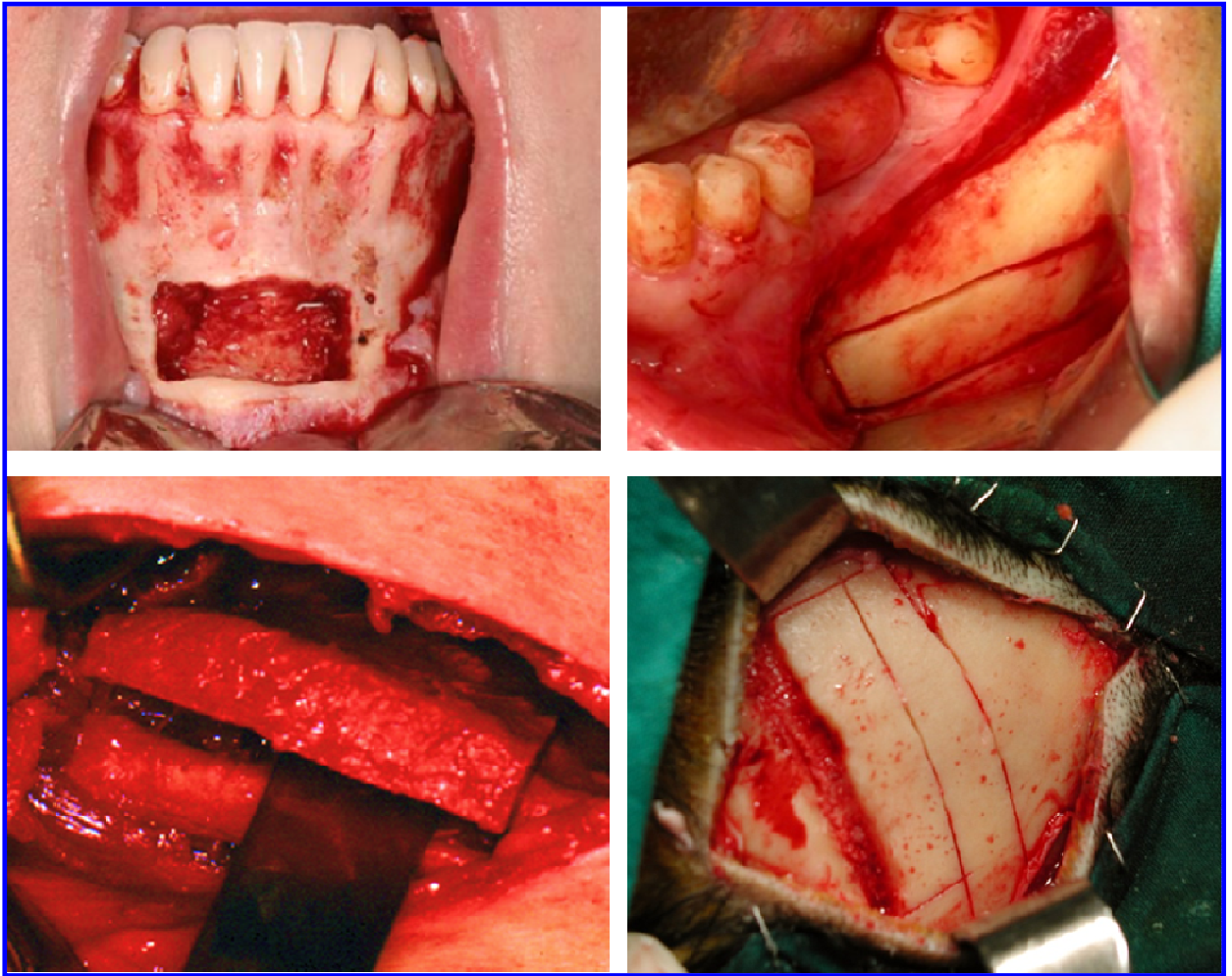


Fig. 43: principali sedi di prelievo di osso autologo intraorali ed extraorali: sinfisi mentoniera, ramo/corpo mandibolare, cresta iliaca anteriore, teca cranica.

### INNESTI A BLOCCO

Questi innesti sono i soli che, immobilizzati con viti di fissaggio, offrono una stabilità meccanica nei confronti della pressione meccanica dei tessuti molli sovrastanti. Il tasso di rivascularizzazione e di riassorbimento dipende dalla microarchitettura (corticale, midollare, corticomidollare), dalla dimensione e dal sito ricevente. Non richiedono l'utilizzo di membrane cellulo-occlusive come nella Guided Bone Regeneration, ed anzi l'utilizzo di membrane può rallentare la rivascularizzazione dal periostio sovrastante<sup>105</sup>. La rivascularizzazione proveniente dal letto del sito ricevente può essere migliorata dalla perforazione della corticale del sito ricevente soprattutto se mandibolare, che facilita la formazione di neovasi nella compagine dell'innesto. Secondo alcuni autori gli innesti corticali provenienti dalla mandibola si rivascularizzano più precocemente di quelli prelevati da cresta iliaca perché hanno la stessa origine embrionale del sito ricevente. Secondo altri i blocchi di

osso compatto della mandibola e della calvaria mostrano una rivascularizzazione più lenta rispetto ai blocchi cortico-spongiosi prelevati da cresta iliaca <sup>106</sup>. Per quanto riguarda il riassorbimento i blocchi corticali sono capaci di mantenere significativamente il volume rispetto ai blocchi di cortico-midollari della cresta iliaca che possono subire un riassorbimento fino al 60% del volume iniziale nell'arco dei sei mesi <sup>107</sup>. I blocchi ossei trovano la loro indicazione di elezione negli aumenti verticali e/o laterali della cresta alveolare prediligendo la natura corticale (sinfisi mandibolare, ramo mandibolare e calvaria) (Fig. 43) di questi per la straordinaria capacità di mantenere il volume nel tempo. I blocchi cortico-midollari da cresta iliaca trovano maggiore indicazione nel rialzo del pavimento del seno mascellare in cui non mostrano riassorbimenti drammatici ed hanno il vantaggio di permettere al chirurgo di inserire immediatamente gli impianti endo-ossei anche in quadri di atrofia ossea estrema.

### **ALLOTAPIANTI**

Gli allotrapianti consistono in osso prelevato da un donatore ed utilizzato in un altro individuo della stessa specie. Il trapianto osseo da un individuo ad un altro viene effettuato in chirurgia ortopedica da oltre 120 anni <sup>108</sup>. Sono di solito conservati in banche dell'osso e possono essere utilizzati sotto forma di osso fresco congelato ( Fresh Frozen Bone- FFB), osso allo genico liofilizzato (Freeze-Dried Bone Allograft- FDBA), osso allo genico liofilizzato e demineralizzato (Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft- DFDBA. Sono disponibili sia in forme di blocchi che di particolato ricavato sia dalla corticale che dalla midollare. Il tessuto osseo omologo rappresenta un materiale interessante in quanto la sua struttura fisica è ovviamente identica a quella del ricevente, e quindi dovrebbe garantire un'osteconduzione efficace, fungendo da supporto alla ricolonizzazione da parte di cellule e vasi sanguigni.

Le forme più documentate in letteratura sono l'FDBA e il DFDBA che sono biocompatibili, possono contenere molecole osteoinduttive come le BMP, ma a concentrazioni variabili in lotti differenti di materiale <sup>109,110</sup>.

Per impedire l'inevitabile scatenarsi della reazione immunitaria dell'organismo ricevente, l'osso omologo viene liofilizzato (FDB) o liofilizzato e demineralizzato (DFDB): il tessuto prelevato viene macinato in particelle di 500 µm-5 mm, delipidato con etanolo puro, disidratato e congelato. Successivamente le particelle vengono ulteriormente triturate fino alle dimensioni di 250-750 µm (FDB). Un ulteriore passaggio, con immersione in acido citrico per 6-16 ore, demineralizza le particelle ottenute (DFDB). La demineralizzazione ed il trattamento "freeze-drying" determinano l'eliminazione della componente mineralizzata e la

liberazione di BMP che inducono la differenziazione di cellule mesenchimali in osteoblasti, aumentandone così le potenzialità osteogenetiche. La demineralizzazione ha lo scopo di aumentare il potenziale osteoinduttivo nell'immediato rendendo più velocemente disponibili le BMP ed altri fattori di crescita presenti nella matrice ossea. Di contro la demineralizzazione comporta la perdita della stabilità meccanica dell'innesto e perciò il DFDBA dovrebbe essere combinato con un altro materiale in grado di mantenere lo spazio quando viene utilizzato in difetti ossei non autocontenitivi. I risultati istologici in uno studio sperimentale comparativo in mandibole di mini-pig hanno dimostrato come gli allo trapianti rallentino la neoformazione ossea rispetto agli autoinnesti <sup>104</sup>. L'FDBA e il DFDBA indiscutibilmente contengono quantità variabili di molecole osteoinduttive e hanno portato buoni risultati clinici <sup>111</sup> ma è ancora discutibile che queste siano presenti in concentrazione sufficiente a scatenare una risposta osteoinduttiva clinicamente rilevante e se siano presenti in forma attiva.

L'osso omologo congelato (FFB) viene preparato dalle Banche dell'Osso in tutto il mondo secondo protocolli talvolta diversi ma che recepiscono quelle che sono le linee guida del Muskuloskeletal Council of the American Association of Tissue Banks (AATB) e dell'European Association of Muscolo Skeletal Transplantation (EAMST)<sup>112</sup>. Si stima che negli USA fino all'anno 2000 venissero eseguite più di 500.000 procedure di trapianto/impianto di tessuto muscolo-scheletrico in ortopedia, con circa il 50% in chirurgia vertebrale, con un successivo incremento fino a 750.000 nel 2001<sup>113</sup>. La situazione italiana è diversa per gli aspetti legati alla tipologia dei donatori, all'impianto normativo, all'organizzazione del prelievo, ma sostanzialmente analoga per quanto riguarda la preoccupazione rispetto alla sicurezza ed efficacia dei tessuti utilizzati. Presso la Banca dei Tessuti della Regione Toscana, la selezione del donatore segue uno attento e scrupoloso processo che va dall'identificazione del donatore, alla manifestazione di volontà per il prelievo da donatore, all'idoneità generale del donatore, all'ispezione fisica del donatore, all'esame autoptico e ai test sierologici<sup>114-116</sup>. L'idoneità di una persona per la donazione di tessuto si basa sulla storia medica e sociale, sullo stato clinico, sull'esame fisico, sui risultati degli esami sierologici effettuati sul sangue prelevato e sull'autopsia, se effettuata, ed ha l'obiettivo di ridurre il rischio di trasmissione di patologie dal donatore al ricevente. Le seguenti condizioni costituiscono una causa di esclusione assoluta alla donazione di tessuti:

- per il donatore cadavere, causa di morte sconosciuta (il tessuto può essere utilizzato per il trapianto solo qualora una autopsia abbia chiarito la causa della morte ed escluso le condizioni di cui ai punti successivi).
- malattia ad eziologia sconosciuta.

- storia, evidenza clinica o di laboratorio di infezione in atto da HIV, HBV o HCV o ittero di eziologia sconosciuta.

- soggetti con fattori di rischio per HIV, HBV o HCV:

soggetti con comportamenti sessuali a rischio negli ultimi 12 mesi; prostituzione negli ultimi 12 mesi; uso e.v, i.m. o s.c. di droghe negli ultimi 12 mesi; soggetti emofilici sottoposti a infusione di fattori della coagulazione di origine umana; esposizione percutanea o attraverso ferite aperte o mucose a sangue potenzialmente infetto da HIV, HBV o HCV nei 12 mesi precedenti; soggetti in emodialisi cronica da insufficienza renale cronica da più di un mese; soggetti che hanno trascorso un periodo di detenzione carceraria negli ultimi 12 mesi; malattie veneree diagnosticate o trattate negli ultimi 12 mesi; tatuaggi, piercing o agopuntura negli ultimi 12 mesi, se non eseguiti con materiale sterile, monouso; partners di soggetti con rischio di infezione da HIV, HBV o HCV, come precedentemente definito, negli ultimi 12 mesi.

- infezioni sistemiche che non siano state controllate al momento della donazione, comprese malattie batteriche e infezioni sistemiche virali, fungine e parassitarie o gravi infezioni locali dei tessuti e delle cellule destinati a donazioni.

I test sierologici vengono effettuati entro 12 ore dalla morte del donatore e non oltre comunque le 24 ore, allo scopo di ridurre il grado di emolisi del campione. In caso di positività ad uno dei seguenti test obbligatori, il soggetto risulta non idoneo alla donazione e il tessuto non può essere utilizzato per il trapianto:

- antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg)
- anticorpi anti virus dell'epatite C (HCV)
- anticorpi anti virus HIV 1 e 2
- TPHA o altro test che rilevi gli anticorpi anti treponema

E' obbligatorio effettuare inoltre la ricerca degli anticorpi anti antigene c dell'epatite B (HBcAb): se il risultato è positivo, in assenza di HBsAg, deve essere eseguita la ricerca degli anticorpi anti antigene s dell'epatite B (HBsAb). Se HBsAb è positivo, il donatore è idoneo. Se HBsAb è negativo, deve essere effettuata la ricerca di HBV DNA. Se questa risulta negativa con un test in grado di rilevare almeno 50 UI/ml, i tessuti possono essere utilizzati per trapianto.

Gli anticorpi anti-HTLV-I e II devono essere ricercati per donatori che vivono in aree ad alta incidenza o ne sono originari o i cui partner sessuali provengono da tali aree, ovvero

qualora i genitori del donatore siano originari di tali aree. Se i risultati del test sono positivi, il tessuto non può essere usato per trapianto.

Il prelievo dei tessuti deve essere eseguito il più presto possibile dopo la morte (o arresto circolatorio se si tratta di donatore multiorgano). Per tessuto muscoloscheletrico, cute, vasi e valvole il prelievo deve essere effettuato entro 12 ore dal decesso.



**Fig. 44:** protocollo di preparazione di osso omologo congelato della Banca dei tessuti della Regione Toscana: prelievo da cadavere in sala operatoria, effettuazione dei tamponi e degli esami serologici, lavorazione per preparazione di segmenti ossei in clean room, packaging in tripla confezione sterile e conservazione a -80° in speciali frigoriferi.



Se il corpo viene refrigerato nelle prime 6 ore dalla morte, il prelievo può essere effettuato entro 24 ore dalla morte, prolungabili a 30 ore per il tessuto muscoloscheletrico. Per i tessuti oculari il limite massimo per il prelievo è posto a 24 ore dal decesso. Il prelievo deve essere eseguito nelle stesse condizioni e modalità con cui si svolge un intervento chirurgico in ambito ortopedico (Fig. 44). Immediatamente dopo il prelievo, l'operatore posiziona in condizioni di asepsi il tessuto prelevato all'interno di una confezione internamente sterile, di misure adeguate, contenente l'idonea soluzione di conservazione. Una volta chiuso, la confezione non sarà riaperta né il tessuto in esso contenuto verrà rimosso se non a cura del personale della Banca. La confezione viene conservata alla temperatura di +2°C/+10°C fino al momento del trasporto. All'arrivo presso la Banca durante tutte le fasi di lavorazione e confezionamento si devono usare strumenti sterili, procedure asettiche e condizioni adeguate a evitare la contaminazione e la crescita di microrganismi e a mantenere la vitalità cellulare ove richiesto. Tutte le fasi di lavorazione devono essere effettuate in un ambiente microbiologicamente e climaticamente controllato (clean room) (Fig. 44). Una volta lavorato il tessuto osseo viene conservato in ambiente a temperatura uguale o inferiore a -80°C entro le 12 ore dal prelievo e conservato per 5 anni (Fig. 44).

### **XENOINNESTI**

Gli xenoinnesti sono costituiti da materiale osseo derivato da animali oppure da minerali simili all'osso derivati da coralli o alghe calcificati da cui è stata rimossa la componente organica per eliminare il rischio di reazioni immunitarie e di trasmissione di malattie.

### **MINERALI SIMILI ALL'OSSO DERIVATI DA CORALLI ED ALGHE**

I sostituti ossei derivati da coralli ed alghe hanno guadagnato popolarità in chirurgia ortopedica e maxillofacciale negli anni '80. differenti specie di coralli presentano uno scheletro di carbonato di calcio, con una geometria simile all'osso spongioso umano con macropori interconnessi di 200-600 micron. Il carbonato di calcio corallino viene convertito in idrossiapatite tramite una reazione idrotermica di scambio con il fosforo. Anche se l'idrossiapatite corallina è quasi identica alla componente minerale dell'osso, studi sperimentali hanno dimostrato che il potenziale osteoconduttivo è inferiore a quello di altri sostituti ossei<sup>104</sup>. Chiaramente non esiste nessun effetto osteoinduttivo. Oggi l'idrossiapatite corallina è raramente utilizzata per innesti onlay e procedure di GBR a causa dell'elevato tasso di complicazioni tardive<sup>117</sup>. Infatti se utilizzata come particolato i granuli tendono a

migrare e la quota che rimane nel sito innestato viene prevalentemente incapsulata da tessuto fibroso. I blocchi invece mostrano più spesso una formazione ossea all'interno del volume innestato ma sono inclini a sviluppare deiscenze tardive<sup>117</sup>.

I derivati di esoscheletro di alghe marine costituito da carbonato di calcio vengono convertiti in fluoro-idrossiapatite attraverso una reazione di scambio con fosfato ammonico a 700° C. La struttura morfologica è costituita da pori disposti in parallelo con un diametro medio di 10 micron, collegati da microperforazioni. Tale configurazione dei pori non è quindi ideale per la vascolarizzazione ma è stata documentata sia l'invasione cellulare dei pori che la deposizione di nuovo osso a diretto contatto con la superficie del materiale<sup>117</sup>. La neoangiogenesi avviene nello spazio tra le varie particelle e a differenza dell'idrossiapatite corallina la fluorapatite derivata dalle alghe subisce un processo di riassorbimento per degradazione enzimatica e cellulare ma ad un tasso inferiore agli autoinnesti.

#### **MINERALI OSSEI DI ORIGINE ANIMALE**

Sono i più documentati in letteratura e per produrli viene utilizzato principalmente l'osso spongioso di origine bovina per la sua stretta somiglianza alla spongiosa umana. La componente organica viene rimossa con un trattamento termico o per estrazione chimica, o una combinazione dei due, al fine di eliminare il rischio di reazioni immunologiche e di trasmissione di malattie. In seguito ai primi casi di encefalopatia spongiforme bovina, sono state condotte ricerche specifiche sulla capacità di questi metodi di trattamento del materiale per eliminare completamente le proteine dell'osso bovino<sup>118,119</sup>. Nonostante il rischio ipotetico di residui organici, non sono mai stati riportati episodi di contagio da questi materiali. Al contrario sono stati segnalati casi di trasmissione di HIV ed epatite in seguito all'utilizzo di materiali allo genici<sup>120</sup>.

I materiali ossei bovini deproteinizzati (Deproteinized Bovine Bone Minerals-DBBMs), sono in generale biocompatibili, osteoconduttivi anche se i metodi di produzione hanno un forte impatto sul loro comportamento biologico. Due sostituti ossei di origine bovina ricavati da osso spongioso, uno deproteinizzato con alte temperature, l'altro principalmente a basse temperature e con metodi di estrazione chimica, mostrano proprietà osteoconduttive e riassorbimento in vivo ed in vitro diverse<sup>121</sup>. Questa differenza è imputabile molto probabilmente a cambiamenti nelle caratteristiche di superficie legati ai processi produttivi. Temperature superiori ai 1000° C causano la sinterizzazione dell'idrossiapatite naturale, i cristalli di apatite aumentano di dimensione e gli spazi tra i cristalli scompaiono in larga misura. Questo riduce di fatto la microrugosità e la porosità del materiale.

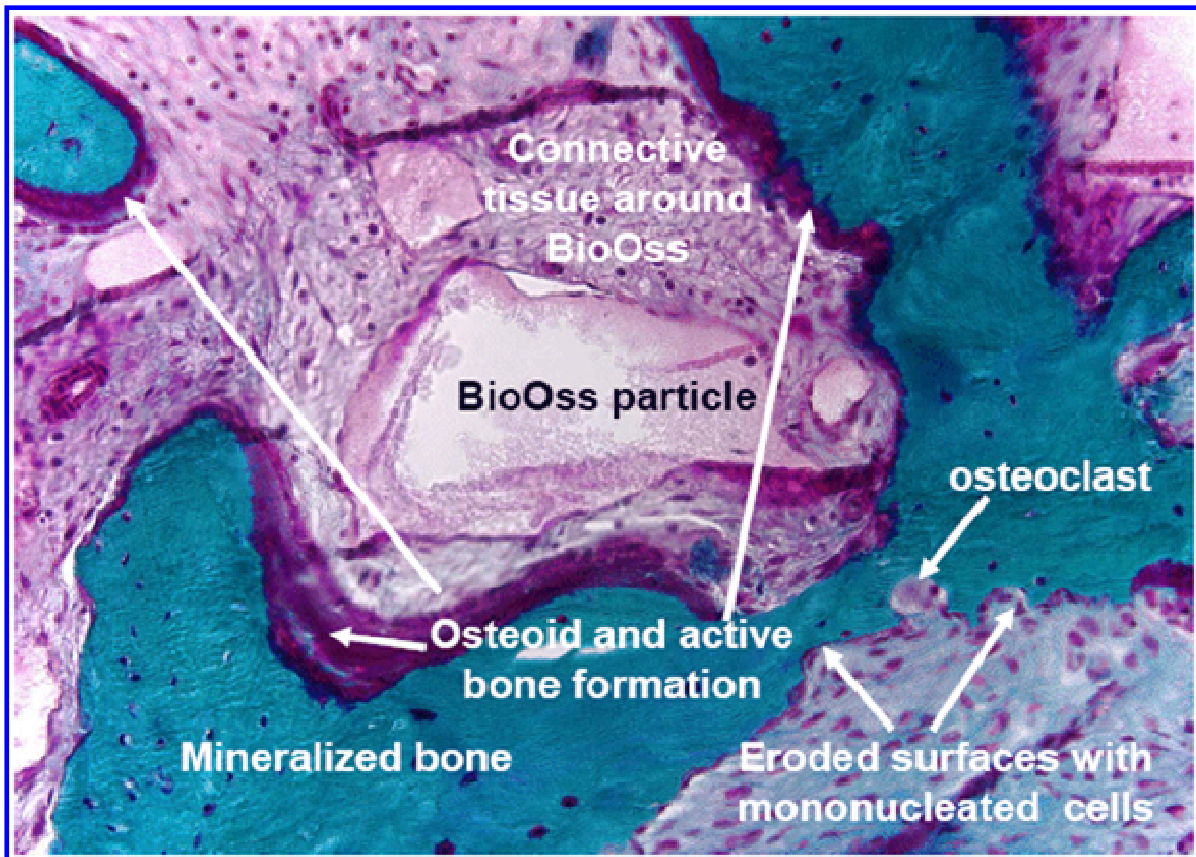


Fig. 45: immagini istologiche di guarigione intorno ad un frammento di osso bovino deproteinizzato (Bio-Oss, Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland): attiva neoformazione a ridosso del biomateriale (osteoconduzione).

Rimangono dubbi riguardo alla reale riassorbibilità del DBBM. E' stato dimostrato in vitro che le cellule progenitrici degli osteoclasti sono in grado di proliferare sulla superficie del DBBM e che siano in grado di produrre delle lacune di riassorbimento. Rispetto al tessuto bovino nativo, tuttavia il DBBM presenta un minor numero di osteoclasti più piccoli e le lacune ossee sono meno pronunciate<sup>121</sup>. Studi sperimentali in vivo hanno mostrato sulla superficie del DBBM la presenza di cellule multinucleate positive alla colorazione fosfatasi acida tartaro-resistente (TRAP)<sup>121</sup>. Questo suggerisce che queste cellule abbiano sostanzialmente attività osteoclastica. Tuttavia gli stessi studi non riescono a dimostrare istomorfometricamente una riduzione del volume del DBBM in periodi di osservazione fino ad un anno. Biopsie umane di innesti sinusali confermano che le particelle di sostituti ossei di origine bovina si possono ritrovare ancora dopo 10 anni dopo l'innesto<sup>121</sup> (Fig. 45).

Di conseguenza tali innesti vanno considerati di fatto non riassorbibili. Questo può rappresentare un vantaggio in quanto rispondono in maniera eccellente in casi in cui si voglia mantenere più possibile il volume osseo ad esempio nelle socket preservation dopo estrazione dentaria, nel rialzo di seno mascellare, nelle procedure di GBR meglio se mischiato in proporzione 50/50 con particolato osseo autogeno<sup>123</sup>.

## SOSTITUTI OSSEI ALLOPLASTICI

Il vantaggio di questi materiali è che essendo completamente di origine sintetica, non presentano alcun rischio di trasmissione di malattie. Un altro motivo perché questi materiali hanno acquisito una crescente attenzione negli ultimi 40 anni, è la possibilità di progettare individualmente ogni singola caratteristica del materiale per una specifica indicazione clinica. Oggi infatti la composizione di questi materiali può essere controllata fino al livello molecolare e così fattori come la dimensione dei macropori e la loro interconnessione possono essere ottimizzate per la rivascularizzazione ed infine si può creare una morfologia specifica di blocchi e granuli di varie dimensione. Tuttavia non sono state ancora identificate tutte le caratteristiche del materiale allo plastico ideale. Si pensa che l'adsorbimento delle proteine ed altre macromolecole presenti nel siero sia di fondamentale importanza per il fissaggio delle cellule osteoprogenitrici ma le caratteristiche di superficie di questa interazione tra materiale e i tessuti è limitata. Inoltre le limitazioni tecniche hanno reso fino ad ora impossibile riprodurre una macroporosità ed una rugosità superficiale che simulino quella del tessuto osseo. I materiali presenti sul mercato sono divisi in tre gruppi: fosfati di calcio, biovetri, polimeri. Di questi i fosfati di calcio (idrossiapatite-HA e il beta-fosfato tricalcico-TCP) sono quelli più utilizzati grazie alla loro composizione che ricorda da vicino la fase inorganica dell'osso<sup>124</sup>. Una vasta gamma di materiali è stata messa sul mercato e molti di loro sono scomparsi altrettanto rapidamente. Molti di questi materiali usciti dal mercato hanno fallito per il falso presupposto che una composizione simile al minerale osseo naturale sia sufficiente ad essere un materiale adatto come sostituto osseo. La maggiore comprensione dell'importanza delle varie caratteristiche quali la microporosità, la ruvidità di superficie, la cristallinità, la dimensione dei cristalli, ha contribuito a chiarire perché materiali con composizione chimica e macromorfologia identica hanno risultati diversi se utilizzati in vivo (Fig. 46).

In generale dai dati presenti in letteratura l'HA è considerata osteoconduttiva e non riassorbibile, mentre il TCP presenta proprietà osteoconduttive ma si riassorbe rapidamente. In difetti ossei autocontenitivi il TCP presenta una guarigione ossea più rapida rispetto ai composti a base di HA<sup>104,125</sup>. La spiegazione è che gli ioni calcio e fosfato rilasciati dalla degradazione del TCP, vengono utilizzati come "materia prima" per la formazione di nuovo tessuto osseo. Il riassorbimento del TCP lascia posto gradatamente alla formazione di nuovo osso con un processo simile alla sostituzione strisciante (Fig. 47).

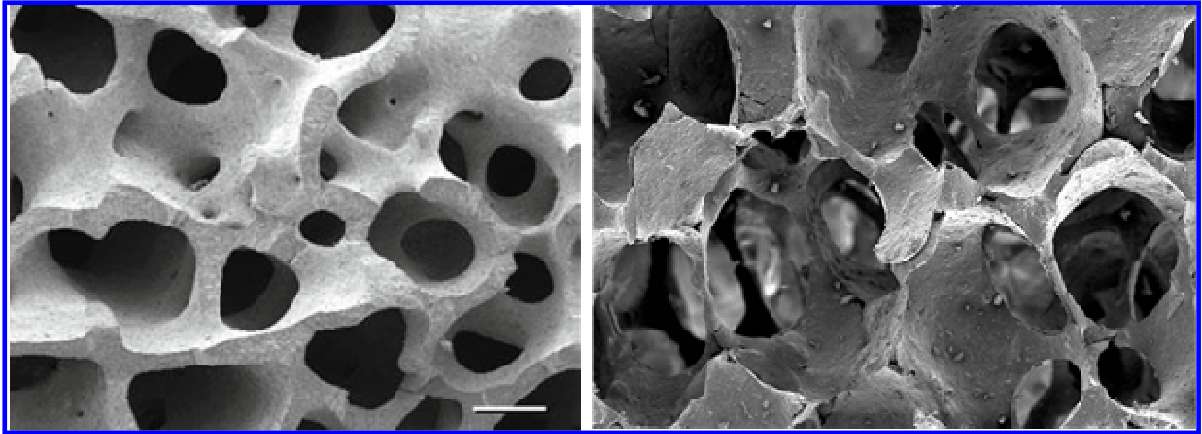


Fig. 46: Immagine al microscopio elettronico a scansione dei micropori dell'idrossiapatite sintetica e del fosfato tricalcico poroso

Tuttavia il riassorbimento di questo materiale lo rende inadatto a situazioni critiche come gli aumenti laterali e verticali di cresta. La capacità di mantenimento dello spazio del TCP semplicemente svanisce prima che l'osso di nuova formazione abbia stabilizzato il volume aumentato<sup>125</sup>.

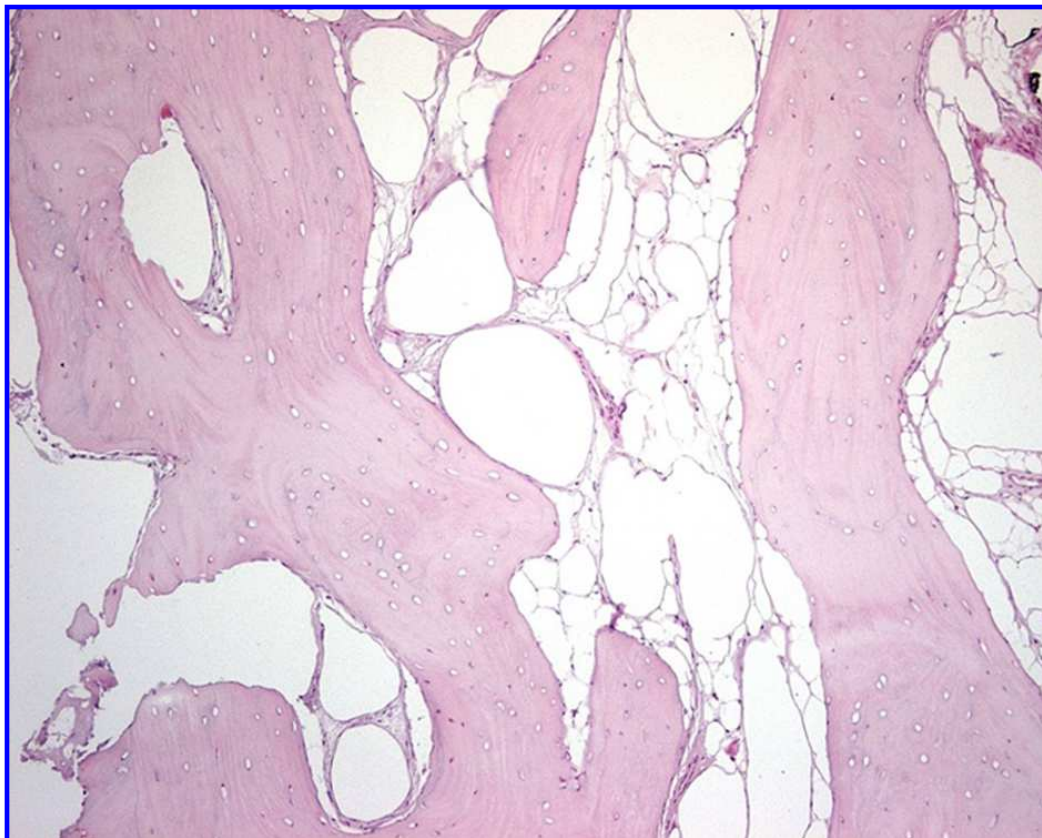


Fig. 47: Innesto di  $\beta$ -TCP (Cerasorb) nel rialzo di seno mascellare: la neoformazione ossea avviene tra una particella e l'altra del biomateriale (osteoconduttività). Courtesy from Prof. Maurizio Colafranceschi, Università degli Studi di Firenze)

Pertanto si sono studiati combinazioni di HA e TCP (fosfati di calcio bifasici) per beneficiare della capacità dell'idrossiapatite di mantenere lo spazio e delle proprietà di riassorbibilità del TCP. Negli studi sperimentali su animali è stato possibile modulare il tasso di sostituzione e bioattività variando il rapporto TCP/HA<sup>125</sup>. Nonostante i fosfati di calcio siano in generale considerati osteoconduttivi, devono ancora essere individuate le caratteristiche di superficie ottimali per raggiungere una osteoconduttività pari a quella dell'osso umano.

I biovetri sono materiali a base di silice che sono stati introdotti nei primi anni '70. questi vetri si legano all'osso grazie alla reattività superficiale dei gruppi silice, calcio e fosfato caratteristici di questi materiali e questo li rende estremamente biocompatibili<sup>126-128</sup>. Anche se il loro utilizzo è documentato sia in procedure di GBR che nel rialzo del seno mascellare, per la loro natura granulare e non porosa non hanno le stesse performance di affidabilità nella rivascolarizzazione mantenimento dello spazio rispetto ad altri materiali<sup>126-128</sup>.

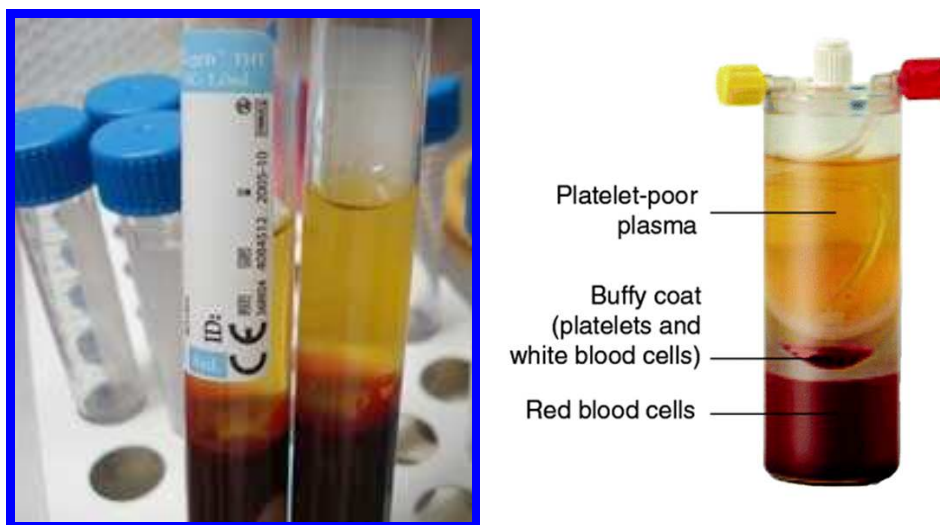
#### **I POLIMERI DELL'ACIDO POLIGLICOLICO E POLILATTICO**

I copolimeri di acido polilattico e poliglicolico sono prodotti di sintesi, altamente biocompatibili, non inducono reazioni immunologiche o infiammatorie, sono dotati di capacità osteoconduttive e sono completamente sostituiti da osso trabecolare. Il materiale si presenta sotto forma di blocco, in granuli ed in gel, e, non essendo radiopaco, permette di meglio valutare la formazione di tessuto osseo nei mesi successivi all'applicazione. Attualmente l'impiego di polimeri sotto forma di gel di acido polilattico e poliglicolico, in un rapporto 50:50, è attuato in associazione ad altri materiali eterologhi che, grazie all'azione aggregante del gel, diventano più facilmente trattabili. Tra i materiali sostitutivi sintetici, sono quelli che presentano un più rapido riassorbimento, che in genere avviene nel giro di 60-90 giorni. Questi polimeri sono risultati essere molto biocompatibili ma devono ancora essere compiutamente studiati, anche se non vengono riportate controindicazioni degne di nota.

#### **MATERIALI OSTEOINDUTTIVI: PRP, COLLA DI FIBRINA E NUOVI COMPOSTI ETEROLOGHI OSTEOPROMOTORI**

I materiali precedentemente descritti svolgono funzione di osteoconduzione, ovvero di sostegno meccanico ai vasi neoformati e alle cellule deputate alla deposizione del nuovo tessuto osseo. Nessuno di loro, tuttavia, è in grado di esercitare anche un effetto di osteoinduzione, ovvero di interagire attivamente con i meccanismi di *signalling* nel sito di

innesto, per modulare positivamente la rigenerazione ossea. Per questo motivo negli innesti ossei con materiale eterologo o sintetico sono stati utilizzati diversi additivi allo scopo di stimolare la deposizione di nuovo tessuto osseo. Tra questi ricordiamo la colla di fibrina, un crioprecipitato liofilizzato di plasma umano composto da fibrinogeno, fattore XIII, fibronectina, PDGF, plasminogeno, antiplasmina aprotinina, trombina, cloruro di calcio e acqua distillata. La colla di fibrina favorisce la formazione del coagulo ematico e stabilizza i materiali da innesto, diminuendo la probabilità che la rigenerazione non avvenga per una perdita di stabilità primaria. Inoltre, la colla di fibrina può fungere da veicolo per le cellule ossee che devono raggiungere il materiale di innesto. Un composto più fortemente osteoinduttivo è certamente il PRP (platelet rich plasma)<sup>129-133</sup> che si ottiene inducendo la precipitazione delle piastrine con una semplice centrifuga da banco, e la coagulazione delle stesse mediante aggiunta di calcio cloruro (Fig. 48). In questo modo la concentrazione piastrinica aumenta, rispetto a quella sanguigna, di un fattore dipendente essenzialmente dai parametri della centrifugazione, ma che oscilla tra 3 e 5.



**Fig. 48: Platelet Rich Plasma ottenuto dopo centrifugazione del sangue**

Le piastrine contengono un insieme di fattori di crescita, tra cui PDGF, IGF, EGF ed altri, che favoriscono la rigenerazione nel sito di innesto. Tuttavia la metodica con cui viene preparato il PRP fa sì che la qualità del precipitato non sia sempre la medesima. Infatti, affinché il PRP sia in grado di esercitare la propria azione è necessario che le piastrine siano integre. Questo implica che si debba raggiungere un compromesso tra il tempo di centrifugazione e la velocità di centrifugazione stessa, il che rende la metodica difficilmente ottimizzabile e ripetibile. Probabilmente per questo motivo vi sono lavori in letteratura che

negano che l'applicazione della metodica abbia una qualche validità, accanto a molti lavori che ne confermano l'efficacia<sup>129-133</sup>. Inoltre a livello legislativo, poiché sia il PRP che la colla di fibrina sono considerati degli emoderivati, nel nostro Paese, ma anche in altri, il loro utilizzo è limitato a strutture autorizzate, e non è permesso estrarli in studi privati.

In ortopedia e in chirurgia orale, ma solo nei Paesi dove è consentito, viene attualmente utilizzata, a scopo osteoinduttivo, anche la matrice ossea demineralizzata di origine umana. Si tratta di tessuto osseo totalmente demineralizzato allo scopo di liberare il collagene osseo di tipo I, che mantiene al suo interno ancora attivi alcuni fattori di crescita. L'utilizzo di DBM (demineralized bone matrix) è ancora soggetto a studio in quanto le preparazioni risultano non omogenee in relazione al contenuto di fattori di crescita<sup>134-135</sup>.

## **IL FUTURO DEI MATERIALI MANTENITORI DI SPAZIO**

Come si è potuto vedere dalla sintetica rassegna dei materiali mantenitori di spazio sopra proposta, esistono ad oggi materiali che rispondono egregiamente sia al requisito di osteoconduttività che di rimodellabilità osteoclastica. Recenti sviluppi hanno portato alla formulazione di derivati del tessuto osseo di origine eterologa che, affiancandosi alla matrice ossea demineralizzata, ai derivati piastrinici, alla colla di fibrina, sembrano in grado di fornire un interessante effetto osteopromotore, capace di sopperire almeno in parte all'utilizzo di osso autologo. Resta comunque aperto il confronto con la frontiera dell'osteogenicità: nessun materiale, tranne l'osso autologo, è attualmente in grado di comportarsi nel sito di innesto come un substrato cellulare capace di sintetizzare attivamente collagene osseo di tipo I, e di indurne la successiva mineralizzazione. Possibili positivi sviluppi in questa direzione potrebbero però venire dall'ingegneria tessutale, abbinata alla possibilità di impiego di cellule staminali adulte. Substrati artificiali o di origine naturale, totalmente rimodellabili per via osteoclastica, rilascianti fattori di crescita e caricati con tipi cellulari in grado di differenziarsi in osteoblasti attivi potrebbero allora rappresentare il superamento di quest'ultima frontiera.

## **L'INGEGNERIA TESSUTALE**

In questi ultimi anni, l'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito lo sviluppo di tecnologie dedicate alla coltivazione ed alla ricostruzione in vitro di tessuti od organi, creando una nuova branca di scienze biomediche che viene denominata ingegneria tessutale.

Questa tecnologia permettere di coltivare cellule staminali autologhe ex vivo e di riutilizzarle nella riparazione di lesioni e rigenerazione di tessuti, mediante coltura in matrici



polimeriche biocompatibili tridimensionali. Modulando opportunamente le caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche da tali matrici è possibile teoricamente rigenerare in vitro tipi diversi di tessuti. Attualmente l'ingegneria tessutale viene utilizzata anche per testare e migliorare le caratteristiche dei sostituti ossei. L'impiego di componenti cellulari, supportati da *scaffold* o *carrier* adeguati, potrebbe condurre a risultati positivi nella riparazione del tessuto osseo, consentendo un miglioramento della tecnica chirurgica.

I tessuti ingegnerizzati si distinguono per il loro processo di produzione, che ha tre momenti fondamentali:

- prelievo di tessuto naturale
- procedure di ingegnerizzazione del tessuto
- realizzazione vera e propria del tessuto biologico ingegnerizzato.

In queste tre fasi, il passaggio innovativo è rappresentato proprio dalla ingegnerizzazione, che determina la trasformazione sostanziale del tessuto di origine, fino ad ottenere un prodotto finale che risulti impiantabile nell'uomo e che sia in grado di favorire o determinare in modi diversi la riparazione tissutale.

L'ingegneria tessutale elabora dunque prodotti di origine biologica fino a creare dei derivati completamente nuovi, con caratteristiche tali da essere usati durante la pratica clinica nella guarigione e nella ricostruzione ossea.

Durante il 1st Tissue Engineering (TE) Symposium, tenutosi nel 1988 in California<sup>136</sup>, si assiste al primo tentativo ufficiale di definire l'ingegneria tissutale come 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. La strategia nuova dell'ingegneria tissutale consisteva nell'avvalersi di cellule viventi (e/o loro prodotti) e di supporti innovativi, per sviluppare sostituti tissutali bioattivi in alternativa agli impianti inerti. Esistono due tipi di approccio: la "tissue engineering" e la "in situ tissue regeneration". Il primo prevede la semina e il differenziamento ex-vivo di cellule osteoprogenitrici autologhe su supporti tridimensionali modificati e riassorbibili (*scaffolds*); i costrutti così ingegnerizzati, una volta reimpiantati nel paziente, dovrebbero essere gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuti vitali grazie all'apporto vascolare e nervoso<sup>137-</sup>  
<sup>139</sup> (Fig. 49).

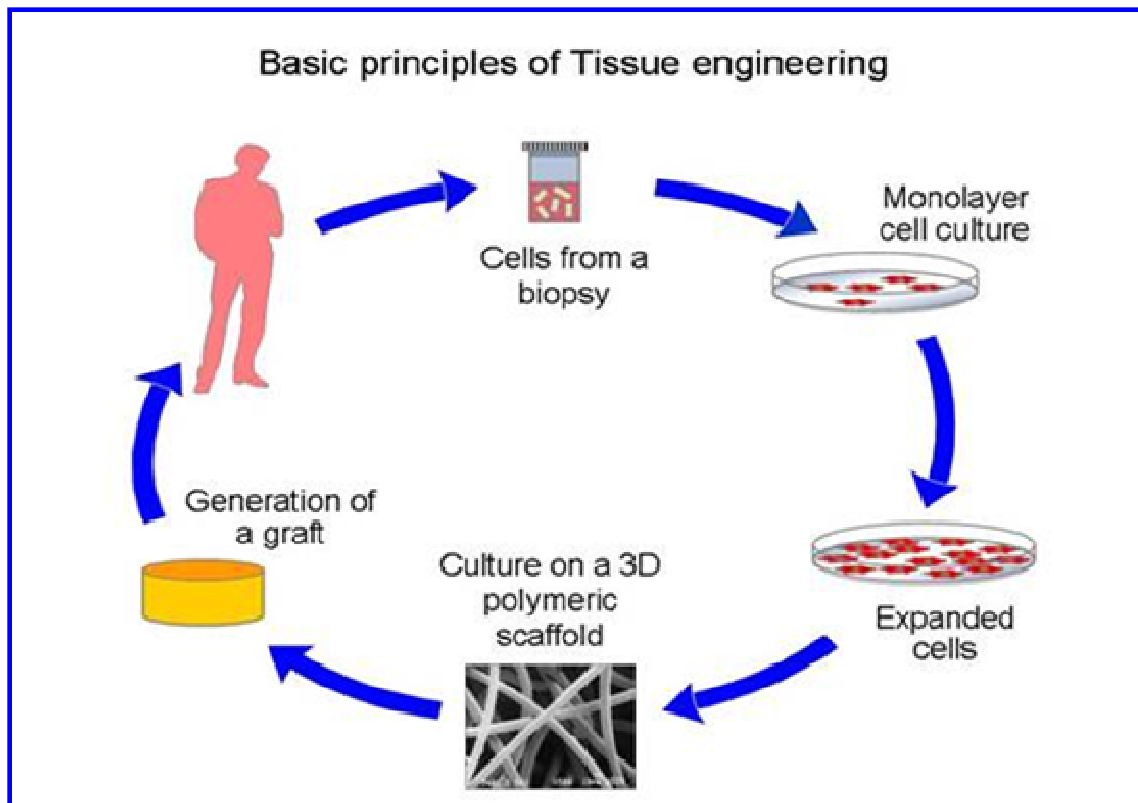


Fig. 49: Schema del work-flow nell'Ingegneria tissutale.

Il secondo approccio associa agli scaffolds materiali in forma di polveri, soluzioni o microparticelle caricate (doped) capaci di promuovere la riparazione locale. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare, come le Bone morphogenetic proteins (BMPs), possono essere coniugate chimicamente al materiale e rilasciate nei tessuti a velocità controllata, per diffusione o frammentazione del supporto<sup>140,141</sup>. 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 realizzare sistemi cellulari (cell-based therapies) sono necessarie le fasi che vanno dalla raccolta di cellule dal sito donatore, la semina sul supporto, l'induzione della proliferazione e del differenziamento cellulare e infine il trapianto del costruito così ingegnerizzato. Al fine di ottenere un'efficace e stabile riparazione occorre ottenere un numero adeguato di cellule o tessuto per riempire il difetto, nonché mantenere il corretto fenotipo cellulare, evitando il de-differenziamento. Le cellule, quindi, dovrebbero organizzarsi in tridimensionale e produrre matrice extracellulare, in modo da ottenere in tempi adeguati una piena integrazione locale con il tessuto ospite e la vascolarizzazione del tessuto neoformato. Un'innovativa risorsa sono le factor-based therapies, che consistono nell'introdurre nel sistema scaffold/cellule uno stimolo osteoinduttivo. Il primo esempio è stato l'uso della Bone demineralized matrix (DBM) e successivamente delle Bone morphogenetic proteins purificate (in particolare BMP-2, -4 e -7

appartenenti alla superfamiglia del TGF- $\beta$ ). Questi fattori di crescita, tuttora oggetto di studio ma già applicati anche in clinica, sembrano validi induttori della rigenerazione. Attualmente però l'unico fattore di crescita approvato dal FDA statunitense è la BMP-2 applicata nella fusione lombare anteriore entro uno specifico 'device'. Gli aspetti complessi di questa tecnica comprendono la difficoltà di legare in modo funzionale i fattori a molecole di trasporto o ai supporti, ma anche quella di modulare in maniera efficace l'emivita e il rilascio graduale. Un'altra strategia (gene therapies) prevede l'uso di vettori virali, come gli adenovirus, contenenti cDNA per BMP-2 ricombinante: le cellule ingegnerizzate diventano quindi semplici carrier dei geni appropriati e producono il fattore osteoinduttivo<sup>142</sup>. Questo approccio comporta inevitabilmente un alto rischio di trasmissione di vettori patogeni.

### SCAFFOLD

Gli scaffolds per tessuto osseo possono essere costituiti da materiali naturali come collagene, fibrina, acido ialuronico e membrane biologiche, che hanno struttura simile ai tessuti originali. Nonostante questo, tali materiali risultano spesso di difficile preparazione e modellazione nei formati necessari, nonché possibili veicoli di malattie o infezioni. Elementi come il calcio e il fosfato, i componenti minerali fisiologici dell'osso, si ritrovano nelle ceramiche di origine naturale e non, reperibili in formulazioni (come idrossiapatite,  $\beta$ -tricalcio fosfato e calciofosfato bifasico) e forme diverse (blocchi, cementi, rivestimenti di impianti metallici). Questi materiali sono strutturalmente molto simili all'osso e parzialmente modulabili nella porosità. L'idrossiapatite (HA) ha dimostrato essere un materiale intrinsecamente osteoconduttivo: i fattori di crescita sono naturalmente attirati e adsorbiti in vivo entro le cavità della struttura porosa. Tuttavia i tempi di degradazione sono lunghi, anche dell'ordine di anni, e la scarsa resistenza meccanica al carico e all'impatto, fa considerare le ceramiche relativamente 'fragili'. I polimeri sintetici sono, invece, altamente modulabili nella forma e nella struttura chimica. I poliesteri alifatici sono i polimeri più usati nell'ingegneria del tessuto muscoloscheletrico (osso, cartilagine, menisco): l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLLA), i loro copolimeri (PLGA), e il poli- $\epsilon$ -caprolattone (PCL) fanno parte di questa famiglia. La degradazione avviene in tempi veloci (settimane) per PGA e PLLA e lenti (mesi) per PCL<sup>137-142</sup>.

### CELLULE

Qualunque sia il materiale di base, il sostituto osseo deve interagire con l'ambiente e le cellule sia in vitro che in vivo. Come già riportato, lo scaffold migliore è quello capace di

stimolare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare favorendo così la rigenerazione e l'integrazione nel tessuto osseo preesistente. Le cellule infatti possono essere coltivate in vitro ma non riescono ad organizzarsi tridimensionalmente ed hanno perciò bisogno di substrati tridimensionali su cui crescere. Gli interventi riparativi mediante tissue engineering si avvalgono perciò dell'uso di cellule, precedentemente isolate, che vengono seminate sullo scaffold prima del suo impianto nel paziente (sistemi cellulari). Le cellule candidate a questo impiego sono cellule mature o cellule staminali embrionali (ES), germinali (EG) e adulte (come le BMSC) (Fig. 50). Le cellule mature (pre-osteoblasti ed osteoblasti) isolate da biopsie tissutali possono essere reimpiantate nello stesso donatore evitando reazioni di rigetto e trasmissione di malattie, ma non sono le migliori data la bassa capacità replicativa. Le staminali, al contrario, sono cellule indifferenziate capaci di rigenerarsi per tempi prolungati.

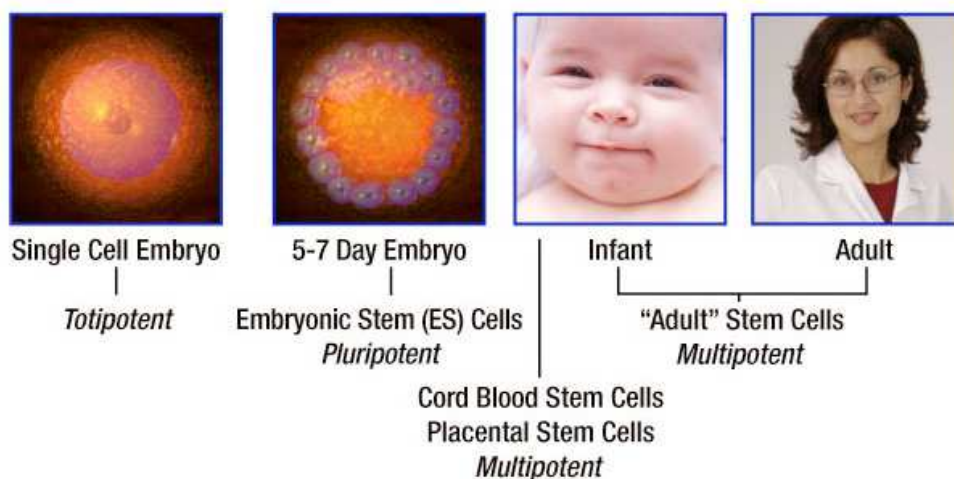


Fig. 50: Origine delle cellule staminali

Quelle embrionali teoricamente possiedono un illimitato potere proliferativo in coltura ma sollevano, come è ben noto, problematiche di natura etica. Le cellule staminali adulte hanno mostrato una sorprendente versatilità ed un discreto potenziale proliferativo; per questo sono adatte per la rigenerazione tissutale, anche se la 'spinta' replicativa decresce quando sono mantenute in coltura in vitro (25-40 passaggi). Le cellule staminali adulte del compartimento osseo sono chiamate osteoprogenitori, cioè i precursori delle cellule mature, che ancora sono presenti nei tessuti midollari. Il midollo osseo adulto contiene, oltre a staminali emopoietiche, cellule staminali non emopoietiche di tipo mesenchimale (Bone Marrow Stromal Cells o BMSC)<sup>142</sup> (Fig. 51).

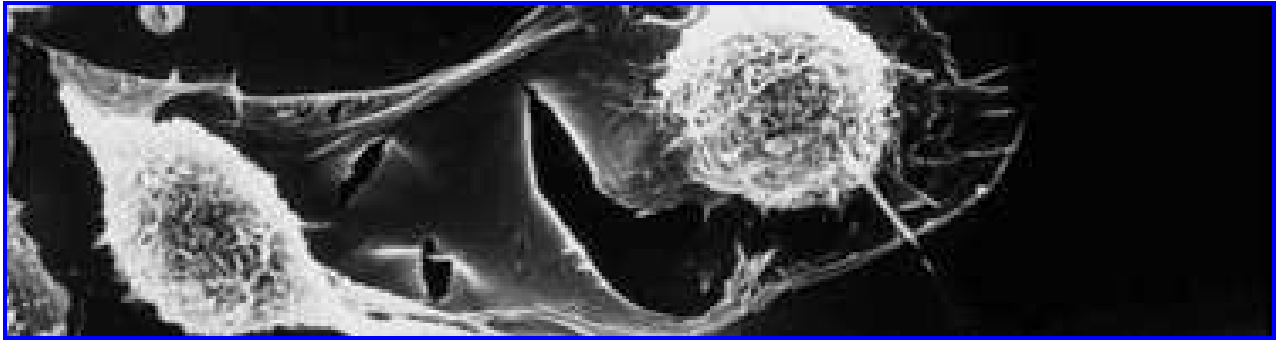


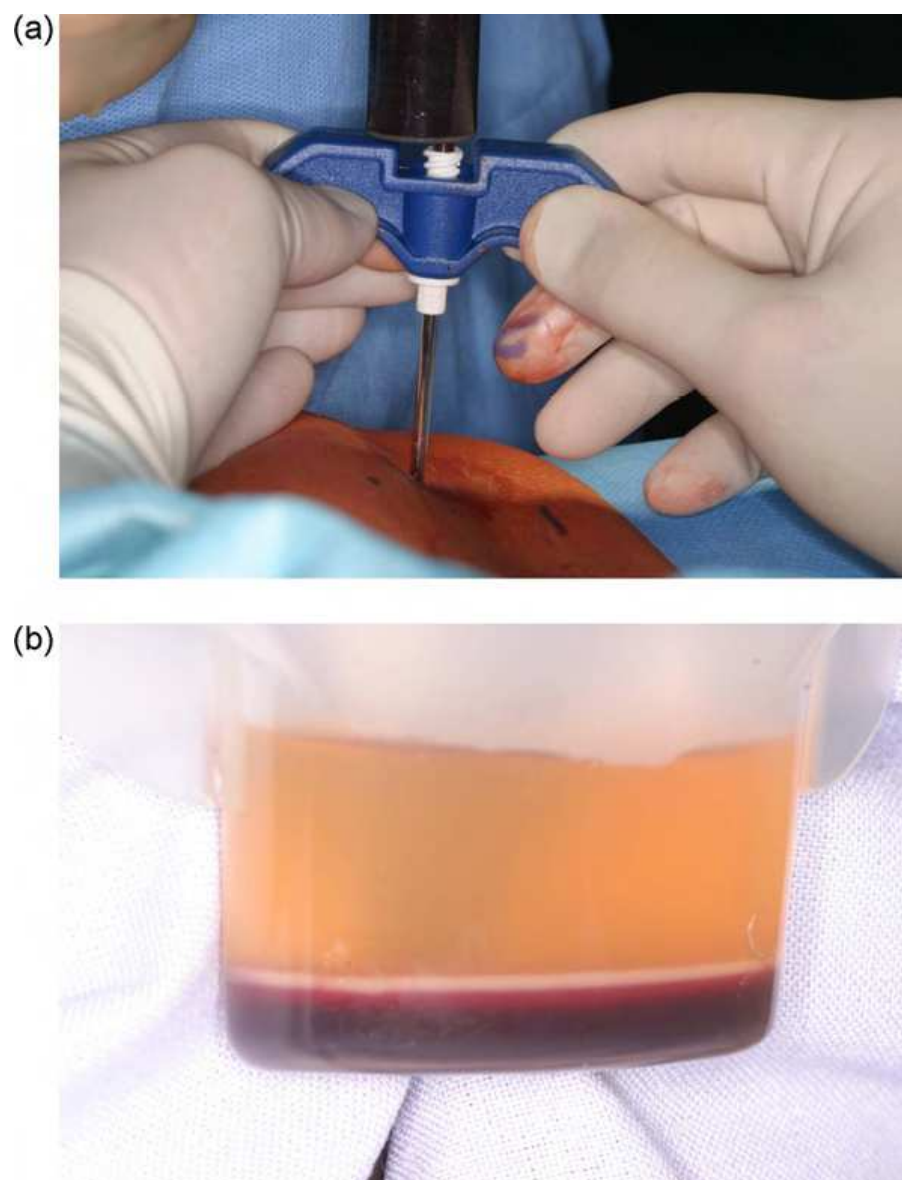
Fig. 51: Bone Marrow Stromal Cellc (BMSC) al microscopio a scansione

Le staminali mesenchimali sono dotate di capacità di automantenimento e di multipotenzialità, cioè capacità di differenziarsi in osteoblasti, condrociti, adipociti, miociti e fibroblasti. Un limite al loro utilizzo è che gli osteoprogenitori rappresentano solo lo 0,001%<sup>143</sup> delle cellule nucleate nel midollo osseo di un adulto sano; una frazione inferiore di quasi due ordini di grandezza, rispetto alle staminali ematopoietiche. Inoltre non sono facilmente accessibili: per ottenerle è necessario un aspirato midollare (solitamente da cresta iliaca), intervento disagiata e a rischio di complicanze per il paziente. Ciò nonostante questa popolazione di precursori mesenchimali è considerata una promettente fonte di cellule per applicazioni in ingegneria tissutale, grazie alla caratteristica pluripotenza, cioè la proprietà di differenziare in cellule dei tessuti sopra citati, sotto un opportuno stimolo. Nel caso del tessuto osseo, dopo il prelievo e l'isolamento, le BMSC possono essere selezionate per aderenza al substrato di coltura ed espanse in vitro in appropriate condizioni. Terreni addizionati con Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) e desametasone ne inducono il commitment in senso osteogenico<sup>144</sup>. Il differenziamento in osteoblasti maturi, la secrezione della matrice extracellulare e la sua mineralizzazione si ottengono con l'aggiunta al mezzo di coltura rispettivamente di acido ascorbico (necessario per il cross-linking delle molecole di collagene) e  $\beta$ -glicerofosfato.

Le colture cellulari possono essere espanse e mantenute in condizioni di vitalità in specifici bioreattori in cui per infusione o perfusione le cellule possono essere assemblate a scaffold tridimensionali che possono poi essere reimpiantati in vivo. Questa metodica che deve essere ancora perfezionata e resa standardizzabile è sicuramente il futuro ma attualmente è una metodica ad elevati costi e richiede tempi e organizzazioni complesse che non prevede attualmente una applicazione clinica routinaria.

Oltre a prelevare cellule staminali e spanderle in specifici bioreattori e reimpiantarle nell'uomo, un'altra metodica è quella di prelevare e concentrare le cellule staminali del midollo osseo e reimpiantarle direttamente nel sito da rigenerare miscelandole a innesti ossei

e carrier. Nella nostra pratica clinica otteniamo le cellule staminali (BMSC , Bone Marrow Stromal Cells) in modo agevole e senza particolari manipolazioni, mediante un aspirato di midollo osseo, eseguito in occasione della stessa seduta operatoria e generalmente senza procedure anestesiolgiche aggiuntive. Le sedi da cui il midollo osseo può essere prelevato sono varie, ma comunemente viene scelta la cresta iliaca, attraverso l'aspirazione con un apposito ago: è possibile, in questo modo, ottenere un quantitativo sufficiente di aspirato che, trattato con anticoagulanti e opportunamente centrifugato con apparecchiature dedicate permette di ottenere, in pochi minuti, una soluzione concentrata di pochi cc con un numero elevato di cellule nucleate tra cui sono presenti anche le cellule staminali<sup>145</sup> (Fig. 52). Come oramai dimostrato sia in ambito sperimentale che sui tessuti umani, nella pratica clinica tale miscela è caratterizzata da percentuali di cellule progenitrici significativamente aumentate rispetto al prelievo basale e risulta particolarmente attiva dal punto di vista biologico-rigenerativo, tanto da poter essere introdotta anche da sola, oltre che con innesti ossei. Le cellule staminali possono essere ottenute anche mediante filtrazione e direttamente perfuse nell'osso morcellizzato o introdotte in uno scaffold, come ad esempio una matrice di collagene, ottenendo in tal modo una struttura tridimensionale malleabile e deformabile utile per colmare particolari difetti in sedi specifiche. Sono in atto attualmente ricerche presso il nostro reparto e nel mondo<sup>146,147</sup> atte ad identificare metodiche standardizzate e ripetibili riguardo la concentrazione stabile di tali cellule, alla loro reale capacità di indirizzarsi verso fenotipi osteoblastici e ad individuare il carrier ideale.



**Fig. 52: Aspirazione della midollare della cresta iliaca (a) e dopo centrifugazione (b): la maggior parte del supernatante viene eliminata e la linea bianca corrisponde al concentrato di cellule nucleate (BMSC)**