

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le riabilitazioni implanto-protesi sono ad oggi un elemento fondamentale nella pratica clinica odontoiatrica e permettono di assolvere alle richieste estetiche e funzionali di un numero importante di pazienti edentuli parziali o totali. Questo successo è confermato da innumerevoli contributi scientifici che mostrano a lungo termine un elevato successo implantare e protesico nell'inserimento degli impianti endoossei in osso originario quando vi sia un'adeguata quantità di osso residuo. L'evoluzione tecnologica ha permesso nel corso degli anni di limitare al massimo il ricorso agli innesti ossei, l'utilizzo di impianti "corti" associati allo sviluppo di superfici "rugose" che aumentano di fatto la superficie di contatto osso/impianto, l'utilizzo di impianti inclinati pre e post seno nel mascellare superiore e intraforaminali nella mandibola, impianti zigomatici, l'utilizzo di software che permettono di simulare virtualmente l'intervento di inserimento implantare per individuare meglio i siti chirurgici rispettando le strutture anatomiche nobili, sono la massima espressione della ricerca clinica allo scopo di ridurre il discomfort dei pazienti in termini di complicanze chirurgiche e tempi di trattamento.

Tuttavia esistono ancora oggi casi di estrema atrofia settoriale o totale dei processi alveolari in cui le riabilitazioni implanto-protesi sono effettuabili esclusivamente in seguito a tecniche di rigenerazione ossea.

Un'antica tradizione fa risalire la nascita dei trapianti omologhi al 287 d.c., quando i Santi Cosma e Damiano sostituirono miracolosamente la gamba andata in gangrena del loro sacrestano con quella di un moro etiope deceduto poco prima.

Il primo innesto omologo documentato risale al 1880 ad opera di un chirurgo ortopedico scozzese che ricostruì l'omero infetto di un bambino di 4 anni mediante un innesto di tibia ottenuto da un altro bambino affetto da rachitismo<sup>327</sup>. Da allora c'è stato un interessamento sempre più diffuso e crescente sull'utilizzo dell'osso omologo<sup>328</sup>, oltre che allo sviluppo di sostituti ossei per ovviare al ricorso al prelievo autologo. La creazione già nel 1949 della US Navy Tissue Bank<sup>329</sup> segna l'inizio di un percorso che ha portato ad oggi alla nascita di un numero crescente di banche dell'osso e dei tessuti muscolo-scheletrici in generale, in molti paesi del mondo<sup>330</sup>. Gli innesti di osso omologo sono usati da molto tempo in chirurgia ortopedica con successo in molte situazioni cliniche e ci sono studi prospettici che mostrano come l'uso di questi innesti nella chirurgia della scoliosi sia superiore all'innesto di osso autologo da cresta iliaca<sup>331</sup>. Lo svantaggio dell'osso omologo è legato alla sua antigenicità e alla possibile trasmissione di microorganismi patogeni dal donatore al ricevente. Con gli standard attuali delle moderne banche dell'osso il rischio di

trasmissione è di 1:200.000<sup>330</sup> per il virus dell'epatite C e di 1:1,6 milioni<sup>332</sup> per il virus dell'immunodeficienza acquisita per l'utilizzo dell'osso omologo congelato (deep-frozen) con nessun nuovo caso segnalato dal 1985<sup>333,334</sup>. Il rischio dell'utilizzo di questo tipo di osso è quindi oggi praticamente inferiore ad una trasfusione di sangue<sup>334</sup>.

Sono stati riportati 5 casi di infezione da HCV nel 2002, in seguito a titoli virali sub-clinici nel donatore<sup>335</sup>, perciò molti autori hanno invocato l'utilità di procedere ad una sterilizzazione finale ai raggi gamma per questo tipo di trapianti. In realtà lo standard di esposizione utilizzata negli Stati Uniti è di 25kGy, ed è stato riportato come siano necessari almeno 50kGy per inattivare l'HIV<sup>336-33</sup>. Di recente inoltre sono stati riportati casi di morbilità e uno di mortalità correlata alla contaminazione batterica di materiale da innesto da cadavere in chirurgia ortopedica<sup>339-341</sup>. Un caso di contaminazione streptococcica è stato riportato come sviluppato da un innesto di tendine patellare utilizzato nella ricostruzione di legamento crociato anteriore in un paziente giovane<sup>342</sup>. La ricerca effettuata dalla banca fornitrice ha evidenziato come il tessuto risultasse già contaminato prima di essere processato ma era risultato idoneo dopo la processazione; altri cinque riceventi dallo stesso donatore non avevano sviluppato alcuna infezione. In un altro contributo<sup>340</sup> su casi con infezione secondaria al trapianto di osso omologo, 13 pazienti su 26 (50%) avevano riportato una infezione da specie *Clostridium*, e 14 pazienti avevano ricevuto il materiale infetto da una stessa banca fornitrice. Anche per questo motivo la sterilizzazione ai raggi gamma del materiale da innesto è stata suggerita per ovviare a tali problemi. In realtà non esiste nessuna evidenza scientifica che la sterilizzazione ai raggi gamma di materiale infetto sia una procedura estremamente efficace e "safe"<sup>342</sup>, inoltre tale procedura provoca alterazioni biologiche e biomeccaniche nel tessuto innestato. L'irradiazione ai raggi gamma induce la liberazione di radicali liberi che tendono a rompere i legami crociati presenti all'interno del collagene<sup>343,344</sup> riducendo di fatto la resistenza meccanica della componente corticale dell'osso fino in una percentuale variabile dal 70 al 87%<sup>345,346</sup>. Nella componente midollare invece l'irradiazione produce una alterazione dei lipidi che risulta citotossica per gli osteoblasti<sup>342</sup> e produce un'azione diretta sulle proteine della matrice cellulare e sulla differenziazione osteoblastica, riducendo di fatto il potenziale osteoinduttivo di una percentuale variabile tra il 44% e il 58%<sup>347</sup>. Anche se non esistono ancora studi randomizzati e controllati al riguardo sembra che l'osso omologo congelato ed irradiato provochi per i motivi suddetti un ritardo nell'incorporazione degli innesti con un ritardo nei processi riparativi, di neovascolarizzazione ed i rimodellamento rispetto all'osso Fresh Frozen<sup>342</sup>. Tutte queste ragioni unite alla mancanza di una dimostrazione sulla

efficacia della gamma-irradiazione sulla sterilità spingono più l'attenzione sull'efficacia degli screening del donatore e sull'accurato controllo di qualità del tessuto prelevato e dal suo corretto "handling" durante le varie fasi di preparazione da parte delle varie Banche. Oggi esistono degli standard imposti dal Musculoskeletal Council of the American Association of Tissue Banks (AATB)<sup>348</sup> e dall' European Association of Musculo Skeletal Transplantation (EAMST)<sup>112</sup> che riducono al minimo la possibilità di reazione antigenica e di contaminazione batterica o virale.

Altre metodiche rispetto al congelamento sono i metodi di "Freeze-drying" (FDBA e DFDBA)<sup>109,110,342</sup>. L'essiccamento e la liofilizzazione portano comunque non solo alla morte cellulare e quindi alla perdita dell'antigenicità del materiale, ma anche alla denaturazione delle proteine della matrice dell'osso e alla conseguente diminuzione del potenziale osteogenetico dell'osso innestato<sup>342</sup>. Inoltre la liofilizzazione comporta una diminuzione delle proprietà meccaniche comparata con l'osso congelato<sup>349,350</sup>. L'osso demineralizzato non tollera il carico assiale<sup>350</sup> e perciò dovrebbe essere destinato a procedure di innesto soprattutto in caso di blocchi in aree in cui la concentrazione dello stress da carico è bassa. Inoltre questi preparati omologhi, sebbene siano legati ad una limitata immunogenicità, hanno mostrato un lento riassorbimento e una non completa incorporazione col sito ricevente<sup>351-353</sup>.

Gli innesti ossei possono ricreare un nuovo supporto osseo attraverso tre meccanismi osteogenesi, osteoinduzione ed osteoconduzione<sup>354</sup>. L'unico materiale ad oggi che abbia un reale potenziale osteogenetico è l'osso autologo.

Alcuni contributi scientifici hanno dimostrato come sia possibile mantenere vitali anche le cellule contenute all'interno dell'osso omologo congelato. Simpson e coll.<sup>355</sup> hanno coltivato in vitro cellule estratte da teste di femore congelate a -80° C dopo un periodo di quarantena di almeno sei mesi. Tali cellule poste in adeguato mezzo di coltura non solo sono andate incontro a proliferazione ma la reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) ha mostrato la produzione da parte di queste cellule di m-RNA per il collagene di tipo I, osteocalcina e sialoproteine, confermando la natura osteoblastica di queste cellule. Su questa linea la strategia di alcune banche dell'osso si è basata sul miglioramento delle capacità di integrazione biologica degli innesti omologhi riducendone l'antigenicità e nel contempo preservandone le capacità biologiche mediante il mantenimento della vitalità cellulare. Il protocollo di congelamento a -80°C unito all'utilizzo di sostanze crioprotettive come il dimetilsolfossido (DMSO) permette la deplezione selettiva delle principali antigen-presenting cells, riducendo di fatto

l'immugenicità dell'innesto e favorendone quindi l'incorporazione<sup>356,357</sup>. Secondo alcuni Autori inoltre questo trattamento (CryoDMSO) sarebbe direttamente coinvolto nel processo di rivascularizzazione, pre-requisito per una corretta integrazione di qualsiasi innesto<sup>358</sup>. Il dimetilsolfossido è una sostanza organica utilizzata diffusamente in criobiologia per la conservazione di organi, tessuti e cellule staminali embrionali per prevenire i danni cellulari da formazione di cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule. Il materiale omologo da noi utilizzato in questo studio non prevede l'utilizzo di DMSO, per la sua relativa tossicità e poiché la capacità rigenerativa dell'osso innestato è solo in parte dovuta alla diretta neo-apposizione ossea da parte delle cellule osteogenetiche sopravvissute all'espianto. Del resto anche nel caso dell'osso autologo, sono poche le cellule che sopravvivono al trapianto per interruzione della vascolarizzazione. Le cellule osteoblastiche o preosteoblastiche innestate se sopravvivono al trapianto necessitano di un pronto e repentino apporto di ossigeno e nutrienti e quindi di vasi<sup>359,360</sup>. Le cellule osteoblastiche e pre-osteoblastiche sopravvissute all'innesto sono responsabili solo di un 10% dell'osso neoformato<sup>360</sup>, mentre il resto del potenziale osteogenetico proviene dal sito ricevente e rispettivamente per il 60% dalle cellule endostali e provenienti dai canali haversiani e per il 30% dal periostio<sup>359,360</sup>.

Per questa ragione La banca dei tessuti muscoloscheletrici della Regione Toscana adotta un protocollo più sicuro di non utilizzo di sostanze crioprotettive mediante la distruzione certa di tutti gli elementi cellulari per deposizione al loro interno di cristalli di ghiaccio, di fatto riducendo al massimo la capacità antigenica del materiale. Al di là della capacità osteogenetica del materiale innestato, esiste ormai la consapevolezza che i moderni protocolli di congelamento dell'osso mantengano inalterate le proteine della matrice cellulare e quindi il potenziale osteoinduttivo dei fattori di crescita presenti<sup>361,362</sup>. Rodella e coll.<sup>363</sup> hanno mostrato immunohistochimicamente la presenza di TGF-beta1 e VEGF nel contesto di innesti di osso omologo congelato nelle ricostruzioni del nel distretto maxillofaciale sebbene in quantità inferiori al processo alveolare.

Per quanto riguarda la nostra sperimentazione alcune distinzioni vanno fatte in base alle tecniche utilizzate. Nella procedura di rialzo di seno, come già precedentemente ricordato, il potenziale rigenerativo è dato dal fatto che il seno mascellare è di per sé una cavità self-space-making con pareti ossee preesistenti che lo rendono di fatto un sito facilmente rigenerabile di per sé<sup>317-326</sup> o con l'utilizzo di diversi materiali da innesto. I risultati da noi ottenuti mediante l'utilizzo di chips corticomidollari di cresta iliaca omologa congelata, già pubblicati<sup>364</sup> hanno mostrato una elevata percentuale ( $40,57 \pm 4,22$

%) di osso vitale neoformato rispetto all'utilizzo di altri biomateriali<sup>266-268</sup> e del tutto sovrapponibili con differenze scarsamente significative rispetto all'utilizzo di chips di osso autologo. La percentuale maggiore di osso neoformato e la minor presenza di innesto residuo nel gruppo trattato con osso autologo rispetto al gruppo con osso omologo, depone probabilmente a favore di un più veloce riassorbimento delle chips di osso autologo rispetto a quello omologo ma comunque queste differenze sono debolmente significative da un punto di vista statistico. Inoltre la differenza può essere dovuta al potenziale osteogenetico che l'innesto di osso autologo possiede e l'osso omologo no. A livello istologico in ambedue i contesti la percentuale di osso vitale neoformato (abitato da cellule osteocitarie) è sostanzialmente elevata ed sono rinvenibili chiaramente tutti i meccanismi di riassorbimento e rimodellamento osseo descritti in letteratura nella guarigione dei siti innestati con chips ossee. Oltre il consueto aspetto della osteoconduzione con formazione di osso a diretto contatto con chips innestate e non vitali e gli aspetti di "sostituzione strisciante" secondo un fronte omogeneo di riassorbimento e neo-apposizione ossea, già descritti in letteratura, particolarmente interessante è l'aspetto dell'osso che letteralmente invade in maniera irregolare e importante su più fronti le chips innestate che progressivamente si riassorbono dissolvendosi ("dissolution")<sup>364</sup>. Questo aspetto istologico è rinvenibile solo con l'osso autologo e non è una caratteristica rinvenibile con altri biomateriali o con osso omologo liofilizzato. Questo aspetto è a nostro giudizio il corrispettivo istologico di un materiale che ha mantenuto intatte le proprie capacità osteoinduttive. La capacità osteorigenerativa delle chips di osso congelato è confermata dal dato clinico della sovrapponibile percentuale di sopravvivenza implantare tra osso omologo e autologo in questo studio (94,44% per l'osso autologo e del 94,87% per l'osso omologo). Le percentuali di successo implantare sono in accordo con quelli riportati da svariati contributi scientifici con l'utilizzo di altri materiali con la sola differenza che il timing di inserimento e di carico protesico nel caso di materiali sostitutivi dell'osso devono rispettare tempi di guarigione molto lunghi, da 9 a 12 mesi<sup>175,178</sup>. L'utilizzo dell'osso omologo congelato nel rialzo del seno mascellare consente invece un tempo di guarigione di tre-quattro mesi come l'osso autologo e un tempo di osteonitegrazione di ulteriori tre mesi come in osso non rigenerato. Sono pochi gli articoli presenti in letteratura che riportano risultati istologici e clinici dell'utilizzo dell'osso omologo nel rialzo di seno. Stacchi e coll.<sup>365</sup>, hanno riportato il primo contributo scientifico di utilizzo di osso omologo congelato nel rialzo del seno mascellare con una casistica di 10 pazienti. A differenza del nostro lavoro in questo studio è stata riportata anche una misurazione del

volume ottenuto con l'innesto riportando un guadagno in altezza ossea medio di  $11.7 \pm 1.7$  mm. Altra differenza sta nel protocollo di preparazione del fresh frozen bone che viene trattato con una soluzione di crioprotettivo (DMSO 10%). Il tempo di guarigione riportato dagli autori è stato di 5 mesi per l'inserimento implantare seguito da un ulteriore periodo di cinque mesi per l'osteointegrazione degli stessi impianti. Su un numero totale di 22 impianti inseriti dopo un follow-up di 12 mesi nessun fallimento delle fixtures è stato riportato da questi autori. Le immagini istologiche riportate sono sovrapponibili a quelle da noi ottenute mostrando un attivo rimodellamento osseo, assenza di infiltrato infiammatorio. I dati istomorfometrici indicano una percentuale totale media di osso del  $48.15 \pm 14.32\%$  ma senza nessun riferimento al rapporto percentuale tra nuovo osso e osso innestato.

Viscioni e coll nel 2010<sup>366</sup> hanno riportato un contributo di 47 seni mascellari innestati con osso omologo a blocco e l'inserimento simultaneo di 47 impianti endossei. Dopo un anno di osservazione un solo impianto è stato perso con una percentuale di successo pari al 97,8%. Le biopsie ottenute dopo 4 mesi hanno riportato una percentuale di osso maturo presente dell'80%

In un contributo successivo<sup>367</sup> gli stessi autori in uno studio split mouth di comparazione tra osso omologo congelato (FFB) e osso omologo congelato criopreservato (CFFB), sempre utilizzando osso a blocco da cresta iliaca, riportano una percentuale di successo implantare del 96,4% su 84 impianti inseriti contestualmente agli innesti. Gli autori concludono che impianti inseriti in metodica one-step, nel contesto di blocchi omologhi congelati hanno la stessa percentuale di successo degli impianti inseriti in osso autologo innestato e in osso originale mascellare. La differenza di questi contributi sta nell'utilizzo dell'osso omologo a blocco mentre il materiale da noi utilizzato è stato ridotto in chips e nell'inserimento simultaneo delle fixtures. Il nostro protocollo ha previsto l'utilizzo delle chips poiché dalle revisioni sistematiche della letteratura sul rialzo di seno<sup>266-68</sup>, si evince come il processo di rivascolarizzazione e integrazione degli innesti ossei sia più veloce ed efficace con innesti particolati rispetto a quelli a blocco e come l'inserimento differito degli impianti a guarigione dell'innesto avvenuta sia preferibile rispetto all'inserimento simultaneo all'innesto stesso. A dispetto di queste differenze è confortante il fatto che la percentuale di successo implantare riportata da questi autori sia del tutto sovrapponibile a quella riscontrata in questo studio. Per quanto riguarda la percentuale di osso maturo riportata dell'ottanta per cento di osso maturo è possibile che comprenda sia l'osso neoformato che la componente delle trabecole ossee del blocco innestato ad inlay. Non esistono al momento altri contributi scientifici al momento

sull'utilizzo dell'osso omologo congelato nel rialzo di seno con cui sia possibile paragonare dati clinici istologici ed istomorfometrici. L'ultimo contributo è un nostro case report di utilizzo di chips omologhe in un paziente affetto da cisti sinusale in cui, contestualmente al rialzo è stata effettuata l'exeresi della a cisti e la riparazione della membrana di Shneider<sup>368</sup>. Informazioni utili comparative tra osso omologo ed autologo in chips sono possibili dall'analisi di contributi scientifici come quello di Pelegrine e coll.<sup>369</sup> Questi autori hanno studiato sulla calvaria di 30 conigli le capacità rigenerative all'interno di piccole camere cilindriche riempite con solo coagulo ematico, osso autologo, osso omologo fresh frozen, solo midollare autologa, midollare autologa e osso autologo, midollare autologa e osso fresh frozen. I risultati ottenuti da questi autori indicano come i campioni contenente materiale mineralizzato sia esso omologo o autologo mostrino migliori risultati rispetto al solo coagulo o all'utilizzo della sola midollare, e con risultati istomorfometrici uguali tra osso autologo e osso omologo. Anche se istologicamente le particelle di osso omologo congelato mostravano un più lento riassorbimento, è possibile secondo questi autori, in accordo con i risultati da noi riportati, ottenere la stessa quantità di osso rigenerato in un sito self-space-making utilizzando osso omologo congelato al posto di quello autologo senza differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda la seconda parte del nostro studio riguardante gli aumenti laterali di cresta ossea mediante innesti a blocco sono state proposte diverse procedure chirurgiche per ottenere un aumento delle creste alveolari a lama di coltello, in pazienti parzialmente edentuli: split crest<sup>70-78</sup>, distrazione alveolare<sup>80-83</sup>, GBR (guided bone regeneration)<sup>174-205</sup> con membrane o griglie e innesti a blocco<sup>213-251</sup>. Revisioni sistematiche della letteratura mostrano come sia impossibile stabilire una superiorità di una tecnica rispetto ad un'altra negli aumenti di volume di cresta alveolare<sup>266</sup>.

A nostro giudizio l'innesto d'osso a blocco è la procedura elettiva in questi casi per una serie di motivazioni. Questi, infatti, mantengono il volume in modo nettamente migliore rispetto agli innesti particolari<sup>213,214</sup>; presentano una grande adattabilità al sito ricevente, non richiedono l'utilizzo di membrane o griglie e possono facilmente essere stabilizzati per mezzo di viti da osteosintesi<sup>214</sup>. Parte della letteratura ha mostrato che i tempi di attecchimento degli innesti di osso autologo a blocco a prelievo intraorale sono molto brevi (3-4 mesi)<sup>231-235</sup> rispetto agli innesti extraorali (6 mesi)<sup>236,237</sup>, e che l'inserimento degli impianti, dopo questo periodo di guarigione, ha un successo paragonabile a quello degli impianti inseriti in osso nativo. Questa superiorità biologica dell'osso prelevato intraoralmente (e dalla teca cranica, extraoralmente) era imputata a una

rapida rivascolarizzazione dell'osso di origine neuroectodermica e quindi simile al sito ricevente<sup>237</sup>. Il nostro contributo sugli innesti di osso autologo a blocco prelevati dal ramo mostra invece come, da un punto di vista istologico, anche a distanze di sei-nove mesi dalla procedura chirurgica, al momento dell'inserimento degli impianti, estese parti di osso innestato presentano aree di osso non vitale (NVB) con lacune osteocitarie vuote<sup>370</sup>. Le cellule osteocitarie necessitano, per la loro sopravvivenza, di un apporto ematico presente nelle vicinanze ad almeno 0,1 mm<sup>371</sup>. Risulta, pertanto, che in seguito al prelievo di osso autologo, in accordo con i dati riportati da Ellegaard<sup>372</sup> e coll. e Cugh e coll.<sup>373</sup>, la maggior parte degli osteociti non sopravvive al prelievo e l'innesto presenta vaste aree di necrosi asettica avascolare. Ellegaard e coll.<sup>372</sup> riportano come anche in innesti utilizzati nelle forcazioni dei molari di scimmia, i prelievi istologici riportano come a distanza di una settimana quasi tutte le lacune osteocitarie erano "disabitate" da cellule. Chugh e coll.<sup>373</sup> riportano come in innesti di costola umana dopo una settimana più del 50% delle cellule osteocitarie erano assenti nei prelievi bioptici.

In contrasto con questi e con i nostri risultati Blomqvist e coll.<sup>374</sup> hanno riportato come con un innesto di cresta iliaca autologa nel rialzo del seno mascellare a distanza di un mese il 75–100% degli osteociti risultavano vitali ed evidenziabili all'interno delle proprie lacune. La differenza sta nella diversa tecnica in quanto non si tratta di una tecnica apposizionale con innesto di corticale a blocco e comunque nel fatto che la componente cortico-midollare della cresta iliaca con la presenza degli spazi midollari, si rivascolarizza meglio della spessa corticale del ramo ascendente della mandibola. Inoltre nei reperti istologici di Blomqvist e coll.<sup>374</sup> gli osteociti erano immersi in un osso "woven" di nuova formazione e quindi probabilmente sono frutto di differenziazione di osteoblasti non appartenenti all'innesto e che hanno da poco ultimato la funzione di produzione di osso. La presenza di questi osteociti sono più il segno quindi di una precoce rivascolarizzazione ed invasione cellulare da parte di cellule mesenchimali indifferenziate negli innesti cortico-midollari più che il segno di una reale sopravvivenza cellulare dell'innesto stesso.

E' evidente a nostro giudizio, che la presenza di una struttura ossea compatta di osso lamellare denso rappresenta negli innesti di corticale una barriera fisica alla nuova formazione di neo-vasi, impedendo, di fatto, una pronta rivascolarizzazione dell'innesto stesso<sup>370</sup>. Studi effettuati in campo ortopedico e maxillofaciale hanno dimostrato che la componente cellulare appartenente all'innesto può essere garantita solo negli innesti rivascolarizzati con l'effettuazione di anastomosi vascolari vere e proprie ma non negli innesti liberi<sup>375,376</sup>. Da un punto di vista clinico, sarebbe auspicabile che l'osso non vitale

(NVB) venisse sostituito da nuovo osso vitale prima di procedere all'inserimento degli impianti. L'osso vitale possiede, infatti, caratteristiche meccaniche migliori e la sua presenza garantisce una più prevedibile osteointegrazione<sup>376</sup>. Di fatto, in letteratura, viene riportato che la stabilità volumetrica degli innesti a blocco sia correlata ad una precoce rivascolarizzazione degli innesti<sup>236-240</sup>. Il nostro studio, al contrario, mostra una rivascolarizzazione lenta e difficoltosa dell'innesto con la presenza di grandi quantità di osso non vitale che persistono anche a distanza di molti mesi. La stabilità volumetrica degli innesti a blocco non può essere spiegata quindi con la precoce rivascolarizzazione. La possibile spiegazione della stabilità volumetrica è più da interpretare nella mancanza di un normale pattern fisiologico di riassorbimento e rimodellamento osseo<sup>370</sup>. Le cellule osteocitarie hanno, infatti, proprietà meccanocettive<sup>377</sup> e giocano un ruolo cruciale nel rimodellamento osseo<sup>378</sup>. E' molto probabile che gli osteociti siano coinvolti nel reclutamento di cellule osteoclastiche e nella modulazione della loro attività<sup>377</sup>. E' probabile che ciò avvenga attraverso il rilascio di "signalling factors" quali l'ossido nitrico, le prostaglandine<sup>377</sup> e osteoprogenina, MCSF e RANKL<sup>379</sup> o altri fattori correlati al meccanismo apoptotico cellulare indotto dall'ischemia<sup>380-382</sup>. Perciò, è probabile che la mancanza degli osteociti e la lenta rivascolarizzazione, provochi un rallentamento nei processi di riassorbimento e rimodellamento. E' stato infatti riportato come il riassorbimento dell'osso necrotico da parte degli osteoclasti sia un processo particolarmente lento e difficoltoso rispetto al riassorbimento fisiologico dell'osso durante i processi di rimodellamento<sup>383,384</sup>.

La ritenuta superiorità biologica dell'osso autologo in blocco rispetto ad altri materiali, basata sulla sua capacità osteogenetica, dovrebbe essere rimessa in discussione<sup>370</sup>. Infatti, all'interno del blocco osseo, non esistono né cellule osteoblastiche né preosteoblasti né cellule mesenchimali indifferenziate che possono direttamente partecipare ad una neo-formazione ossea. Le uniche cellule presenti nell'innesto osseo sono appunto gli osteociti, che come abbiamo visto, non sopravvivono al prelievo e comunque, sono elementi cellulari privi di capacità osteogenetica. Il successo degli impianti inseriti in un tempo variabile dai tre ai nove mesi, in un osso parzialmente necrotico e parzialmente rivascolarizzato, può essere soltanto spiegato dall'eccellente stabilità primaria degli impianti in un osso estremamente denso che svolge funzione di eccellente impalcatura meccanica<sup>370</sup>. Il blocco di osso autologo svolge funzione di "grosso osteoconduttore" e anche se ha perso la capacità osteogenetica, possiede una formidabile capacità osteoinduttiva per la presenza di fattori di crescita come le BMP's intrappolati

nella matrice organica dell'osso e che gradualmente, vengono rilasciate durante il processo di rimodellamento ("creeping substitution").

Risultati simili al nostro sono riportati da Zerbo e coll.<sup>385</sup> con innesti a blocco autologhi prelevati dalla sinfisi mandibolare. Questi Autori hanno al pari del nostro studio dimostrato la presenza di osso non vitale e un graduale decremento nel tempo delle aree di osso necrotico nel tempo con un processo di guarigione di approssimativamente 7 mesi<sup>385</sup>. I nostri risultati mostrano come l'osso autologo del ramo richieda tempi superiori per essere del tutto sostituito dall'osso rispetto ai sette mesi. Questa differenza può essere spiegata dalla diversa componente dell'innesto utilizzato, infatti i prelievi a blocco dalla sinfisi contengono una componente midollare e una più sottile corticale e questo può spiegare un più veloce processo di guarigione degli innesti sinfisari rispetto a quelli prelevati dal ramo mandibolare.

Esistono pochi dati in letteratura riguardo l'utilizzo dell'osso omologo congelato (Fresh frozen) a blocco nelle ricostruzioni ossee dei processi alveolari a scopo implantologico. Il primo contributo risale in realtà al 1992 ad opera di un gruppo di autori del Department of Oral and Maxillofacial Surgery dell'Università della California<sup>386</sup>, quali avevano trattato 10 pazienti con osso fresh frozen sia in mandibola che sul mascellare superiore a scopo implantologico riportando risultati promettenti, ma mettendo in guardia per i presunti pericoli riguardanti un eventuale trasmissione di agenti infettivi<sup>386</sup>. Per questo da quella pubblicazione in letteratura si assiste ad un gap temporale di pubblicazioni sul fresh frozen bone in blocchi a scopo implantologico. I risultati da noi ottenuti riguardo alla sicurezza di questo tipo di innesti con biopsie libere da infiltrato infiammatorio, confermato da studi più recenti mostrano la relativa sicurezza di questo materiale. Infatti Spin-Neto e coll.<sup>387</sup> hanno dimostrato come le procedure di innesto blocco fresh frozen non alterano l'equilibrio dei valori ematici soprattutto dei globuli bianchi nei 180 giorni successivi alla procedura chirurgica

Il nostro studio riporta come l'osso omologo congelato mostri istologicamente e clinicamente un comportamento del tutto sovrapponibile all'utilizzo dell'osso in blocco autologo, con gli stessi meccanismi e tempi di attecchimento<sup>388</sup>. I protocolli moderni di congelamento della banca dell'osso hanno dimostrato la preservazione delle proteine della matrice ossea e dei fattori di crescita in essa contenuti. Ciò conferma il potenziale osteoinduttivo nell'innesto omologo congelato. Il blocco di osso omologo congelato è, di fatto, istologicamente e clinicamente paragonabile all'osso autologo; entrambi non hanno

componente cellulare e hanno perso la capacità osteogenetica mantenendo una capacità osteoinduttiva ed osteoconduttiva<sup>388</sup>.

I risultati clinici da noi ottenuti sono in linea con i dati presenti in letteratura al riguardo. In uno studio preliminare del 2009 Barone e coll.<sup>389</sup> hanno riportato i risultati di 24 blocchi cortico-midollari congelati onlay sui mascellari atrofici di 13 pazienti con l'inserimento di 38 impianti ma con un follow-up implantare di solo sei mesi, riportando il fallimento di due soli impianti. Nello stesso anno un altro contributo viene fornito da Contar e coll.<sup>390</sup> i quali riportano i risultati di 34 blocchi di osso omologo congelato nel mascellare superiore in 15 pazienti. Dopo un periodo di attesa di nove mesi sono stati inseriti 51 impianti e sono state effettuate biopsie ossee per valutare istologicamente la guarigione. Gli innesti si erano rivelati clinicamente ben incorporati e di buona consistenza ossea tanto che il torque di inserimento minimo degli impianti è stato di 40 N/cm. Dopo un periodo di follow-up di 24-35 mesi gli autori non riportano alcun fallimento implantare. I risultati istologici mostrano un tessuto osseo neoformato ben integrato con tessuto osseo innestato ma non vengono riportate le rispettive percentuali. Sempre nel 2009 Franco e coll.<sup>391</sup> hanno riportato buoni risultati dell'utilizzo di blocchi cortico-midollari di cresta iliaca omologa congelata in 102 inlay, 27 onlay e 11 veneer graft. I contributi scientifici della stessa Scuola hanno dimostrato una percentuale di successo di impianti inseriti in blocchi di cresta iliaca omologa congelata che varia dal 92% al 100% in accordo con quelli da noi riportati<sup>388</sup> e del tutto sovrapponibili ad altre tecniche incrementali sia con utilizzo di impianti di diametro e lunghezza standard<sup>392-394</sup> che con impianti di lunghezza standard ma di diametro ridotto (<3,75mm)<sup>395</sup>, sia di impianti di diametro standard e lunghezza ridotta (short implants), sia in riabilitazioni fisse<sup>392-395</sup> che rimovibili tipo overdentures<sup>396</sup>. Questi lavori non danno però un contributo rispetto agli aspetti istologici. L'utilizzo di blocchi di osso fresh frozen hanno dato buoni risultati anche come innesti interposizionali dopo osteotomia di Le Fort 1 e inserimento di impianti<sup>397,398</sup> e come riempitivo dopo exeresi di grosse lesioni intraossee<sup>399-401</sup>, confermando le potenzialità osteoconduttive e osteoinduttive dell'osso omologo congelato in difetti critici come valido sostituto a grossi prelievi autologhi. Per quanto riguarda innesti apposizionali sono però a noi più interessanti al fine del confronto con i risultati di questa tesi non solo dati clinici di conferma come ad esempio case report di recente pubblicazione<sup>402</sup>, bensì articoli scientifici che riportino anche risultati istologici soprattutto di confronto tra osso autologo e omologo al fine di chiarire meglio il comportamento biologico di questo materiale da innesto.

Orsini e coll.<sup>403</sup> hanno riportato i risultati di 10 pazienti trattati con blocchi di osso fresh frozen in difetti orizzontali, come nella nostra casistica ed effettuando misurazioni sull'esame TC dopo 5 mesi di guarigione. In questo lavoro non viene specificato che tipo di osso omologo sia stato utilizzato (se corticale o cortico-midollare), non si riportano dati effettivi sul riassorbimento ma solo sull'incremento medio ottenuto (da  $2.3 \pm 0,4$  mm a  $6,8 \pm 05$  mm), ma comunque tutti gli impianti inseriti nei siti rigenerati risultavano integrati a 24 mesi. Delle sole 6 biopsie ossee effettuate la percentuale media di osso riportata è di  $57.5 \pm 24,7\%$ . La deviazione standard riportata in quest'ultimo valore è molto ampia e non consente di fare valutazioni precise del comportamento a livello di rimaneggiamento osseo che appare troppo variabile in così piccolo gruppo di pazienti.

Il primo studio comparativo è stato riportato da Contar e coll.<sup>404</sup> che hanno valutato istologicamente sullo stesso paziente a distanza di 9 mesi di guarigione biopsie ottenute dagli innesti (test) e osso originario mascellare dello stesso paziente (controllo), riportando una differenza non statisticamente significativa tra pattern di rimodellamento osseo, densità e percentuale di struttura collagenica presente nei due gruppi. Anche questo lavoro non può essere comparato con il nostro poiché confronta siti innestati con siti non innestati e non innesti autologhi con omologhi.

Uno studio interessante invece è riportato da Spin-Neto e coll.<sup>405</sup> i quali hanno riportato i risultati di 12 pazienti sempre affetti da atrofia orizzontale ( $<4\text{mm}$ ) di cui sei pazienti sono stati trattati con 12 innesti di osso autologo a blocco e sei pazienti con 17 innesti sempre a blocco ma di osso omologo congelato. A distanza di sette mesi di guarigione tutti gli innesti si erano mostrati clinicamente stabili e ben attecchiti ai rispettivi siti riceventi e istologicamente sia l'osso corticale autologo utilizzato sia l'osso omologo mostravano vaste aree di osso necrotico circondate da poche aree di osso vitale neoformato in accordo con i nostri risultati. Questi Autori rilevano comunque che le biopsie degli innesti di osso autologo sembrano associate ad un stato più avanzato di rimodellamento concludendo che le due procedure d'innesto sono sovrapponibili clinicamente ma istologicamente l'osso omologo mostra un rimodellamento osseo più lento rispetto all'osso autologo.

Lumetti e coll.<sup>406</sup> riportano invece il primo studio clinico-istologico randomizzato e controllato e comparativo tra blocchi autologhi ed omologhi fresh frozen. Lo studio ha coinvolto 24 pazienti affetti da atrofie orizzontali innestati in maniera casuale o con blocchi di osso omologo o con blocchi di tibia omologa. Misurazioni dell'osso sono state effettuate sulle TC post-operatorie immediate e a distanza di 6 mesi per valutare il

riassorbimento degli innesti. Sono stati effettuati anche sempre a 6 mesi, prelievi biotipici per valutazioni istologiche ed istomorfometriche. Si è inoltre provveduto alla doppia somministrazione di doxiciclina a 120 e 150 giorni per “marcare” istologicamente la neoformazione ossea. I risultati riportati da questi autori mostrano come radiograficamente i blocchi di fresh frozen risultino caratterizzati da una densità inferiore a quelli autologhi e come si riassorbano in percentuale maggiore (52%) rispetto agli innesti autologhi (25%). I risultati istologici mostrano una neoformazione ossea simile nei due gruppi ma quelli appartenenti al fresh frozen mostrano chiari segni di infiammazione. Gli autori concludono che gli innesti di osso autologo siano da preferire rispetto a quelli di osso omologo in contrasto con i risultati da noi ottenuti e da altri presenti in letteratura<sup>403,405</sup>. C'è da sottolineare, come del resto riportato dagli stessi Autori, che l'osso omologo utilizzato nel contributo di Lumetti e coll.<sup>406</sup>, deriva dal piatto tibiale in una porzione caratterizzata da una sottile corticale e da una midollare molto rappresentata, quindi di per sé meno densa della corticale della diafisi tibiale da noi e da altri<sup>404</sup> utilizzata. La componente microarchitetturale del blocco (cortico-midollare) è quindi la vera responsabile del riassorbimento e della minor densità riportata da Lumetti e coll.<sup>406</sup> come del resto già responsabile in altri contributi della letteratura per quanto riguarda il riassorbimento dei blocchi corticomidollari iliaci autologhi utilizzati nelle tecniche apposizionali<sup>219</sup>.

Dobbiamo infine ricordare come la maggior parte degli studi, compreso il nostro contributo, riportino risultati su tecniche di rigenerazione ossea orizzontale (veneer grafts) che risulta clinicamente più predicibile di quella verticale (onlay graft) ed inoltre riguardano il mascellare superiore che risulta un sito ricevente ideale per la forte vascolarizzazione. Un recente contributo riporta i risultati di rigenerazioni verticali in mandibola posteriore che notoriamente risulta il sito più difficile da ricostruire. Pimentel e coll.<sup>407</sup> riportano i risultati con 4 anni di follow-up dopo il carico protesico di impianti inseriti in siti innestati con blocchi di osso fresh frozen. Dopo sei mesi di guarigione sono stati inseriti 27 impianti in sei pazienti e dopo 4 mesi di osteointegrazione gli impianti sono stati caricati. A distanza di 48 mesi tutti gli impianti erano ancora osteointegrati e avevano riportato un normale pattern di rimodellamento osseo crestale. Ulteriore sviluppo dell'utilizzo del fresh frozen bone è la sua associazione con fattori di crescita contenuti nel Platelet-Rich Plasma (PRP); Messori e coll.<sup>408,409</sup> in uno studio radiografico ed uno istomorfometrico, entrambi condotti su cani, riportano come l'utilizzo del concentrato piastrinico aumenti in maniera significativa la neoformazione ossea in difetti ossei innestati con FFB. Questi risultati comunque devono essere riscontrati anche in vivo su uomo e

devono essere oggetto di un numero più consistente di studi scientifici visto i risultati controversi riscontrabili in letteratura riguardo ad associazioni di innesti autologhi e il PRP<sup>284</sup>. Ulteriori sviluppi di questo materiale potrebbe essere l'utilizzo come scaffold associato all'utilizzo di Bone Marrow Staminal Cells per tecniche di ingegneria tissutale che si pongano come obiettivo di sostituire ,quando possibile il ricorso a corposi innesti di osso autologo.

Sino ad oggi, i risultati della nostra ricerca dimostrano come non esista una differenza statisticamente significativa, in termini di tempi di attecchimento, rivascolarizzazione e successo implantare tra osso autologo e osso omologo congelato. Poiché il campione di pazienti considerato in questo studio non è sufficientemente rilevante, non può contribuire, in maniera sostanziale, a fornire nuove linee guida per la gestione clinica dei corretti tempi di inserimento degli impianti. Tuttavia, se per il rialzo di seno mascellare con l'utilizzo di chips autologhe e omologhe congelate sono sufficienti 3-4 mesi di guarigione prima dell'inserimento implantare, per gli innesti di corticale a blocchi, la carente rivascolarizzazione e i lunghi tempi di neo-formazione ossea, suggeriscono un periodo di attesa di almeno 4-5 mesi, prima dell'inserimento degli impianti sia per l'osso omologo che per l'osso autologo. Il tempo di attesa per l'osteointegrazione degli impianti sia nel rialzo del seno mascellare, sia nei blocchi corticali, sembra essere di soli 3 mesi senza differenze tra osso omologo congelato e autologo e sovrapponibile a siti ossei non rigenerati.

Si rendono comunque necessari ulteriori studi multicentrici randomizzati e controllati per raccomandare l'uso routinario del Fresh Frozen Bone e per chiarirne definitivamente il comportamento biologico.