

Progetto FAD CIC 2017

LE NUOVE TECNOLOGIE IN PARODONTOLOGIA

Società Italiana di Parodontologia e Implantologia (SIIdP)

Autori della Revisione della Letteratura:

Giulio Rasperini, Claudia Dellavia, Piero Casavecchia

Progetto coordinato da:

Claudia Dellavia

Indice

1. Introduzione
2. Biomateriali impalcatura in parodontologia ed implantologia
 - 2.1. Caratteristiche dei biomateriali scaffold
 - 2.2. Principali biomateriali impalcatura per la rigenerazione ossea e parodontale
 - 2.3. La ricerca scientifica: verso i materiali stampabili
3. Mediatori biologici proposti per la medicina rigenerativa dei tessuti parodontali
 - 3.1. Fattori di crescita
 - 3.2. Terapia cellulare
 - 3.3. Terapia genica
4. Tecnologia Cone Beam Computed Tomography (CBCT) in parodontologia
 - 4.1. Applicazioni della CBCT nei difetti parodontali infraossei e nelle forcazioni
5. Conclusioni
6. Bibliografia
7. Domande

1. Introduzione

Negli ultimi anni, la ricerca nell'ambito della parodontologia (e della implantologia) si è applicata particolarmente allo studio di soluzioni che potessero stimolare in modo predicibile la rigenerazione di difetti ossei e parodontali secondo i principi dell'ingegneria tissutale. I recenti progressi di questa branca sono ascrivibili da un lato alla continua analisi e proposta di biomateriali "impalcatura" (scaffold) sempre più performanti in termini di geometrie, di proprietà fisico-chimiche e di superfici e dall'altro lato alla possibilità di veicolare nel sito da rigenerare alcuni mediatori biologici quali fattori di crescita, cellule staminali e geni che possono essere rilasciati da soli o caricati all'interno degli scaffold in modo da regolare la risposta infiammatoria del sito e stimolare così la rigenerazione del tessuto parodontale. Le nuove tecnologie hanno inoltre consentito di produrre scaffolds biocompatibili personalizzati secondo l'anatomia del paziente associando i recenti progressi della medicina rigenerativa a quelli della radiologia.

Quest'ultima disciplina ha beneficiato in modo particolare dell'avvento delle tecnologie moderne per quanto riguarda gli aspetti diagnostici delle malattie parodontali, colmando i limiti della tradizionale valutazione radiografica dell'anatomia del parodonto. In particolare l'applicazione della Tomografia Computerizzata Cone Beam in parodontologia permette ad oggi di acquisire dati tridimensionali (3D) sulla morfologia dei difetti intraossei e delle forcazioni radicolari, altrimenti non forniti dagli esami bidimensionali, sottoponendo i pazienti ad un'esposizione di raggi più bassa rispetto a quella delle tecniche tridimensionali convenzionali quali la tomografia computerizzata. Occorre tuttavia valutarne attentamente la necessità nel singolo caso clinico, in quanto si tratta di un esame invasivo che presenta ancora un'elevata dose di radiazioni.

In questo progetto saranno quindi illustrati lo stato dell'arte della medicina rigenerativa parodontale e l'attuale evidenza scientifica a supporto dell'utilizzo delle nuove tecniche radiologiche 3D per la diagnosi dei difetti parodontali.

2. Biomateriali impalcatura in parodontologia ed implantologia

a cura di Giulio Rasperini

La funzione di impalcatura (*scaffold*) è una delle funzioni basilari dei materiali utilizzati nell'Ingegneria Tissutale. Consiste nel fornire un supporto sul quale le cellule possano basarsi per costruire il tessuto da rigenerare e dettano perciò la forma e composizione dello stesso. In molti casi la funzione di scaffold è utile anche per mantenere il cosiddetto effetto tenda o di mantenimento dello spazio, impedendo il collasso dei tessuti all'interno del difetto e dando perciò tempo alle cellule di popolare lo spazio. Nonostante l'effetto scaffold non riguardi solamente i tessuti duri ma altresì i tessuti molli, le nostre conoscenze in materia sono principalmente legate ai loro utilizzi in chirurgia ossea ricostruttiva e nella rigenerazione parodontale. Solo recentemente alcuni materiali scaffold sono stati introdotti anche in chirurgia mucogengivale per l'ispessimento dei tessuti molli.

2.1. Caratteristiche dei biomateriali scaffold

L'utilizzo di biomateriali scaffold nella rigenerazione ossea e parodontale si è concentrato dapprima sull'interazione del biomateriale con le cellule deputate alla formazione di nuovo osso. Meno conosciuto è il ruolo degli scaffold nell'interazione con le cellule deputate alla formazione di altri tessuti parodontali; è stata tuttavia dimostrata la capacità di alcuni biomateriali di facilitare e rendere possibile la neoformazione di tutti i tessuti facenti parte del parodonto (Murphy & Gunsolley 2003; Wang et al. 2005). Ma è bene ricordare che non tutti i materiali presenti in commercio hanno le medesime caratteristiche! La normativa europea prevede, infatti, che per essere commercializzato un biomateriale da innesto debba essere biocompatibile, che siano stati fatti studi per dimostrare che il biomateriale sia sicuro e non causi reazioni avverse nei pazienti e che ne sia stata dimostrata l'efficacia. E proprio su quest'ultima caratteristica, l'efficacia, è possibile riscontrare differenze anche notevoli tra diversi biomateriali da impalcatura.

Sicuramente, la prima domanda da porsi nella scelta di un materiale scaffold è: quali caratteristiche dello scaffold sono più importanti nella risoluzione del caso che mi accingo a trattare? In alcuni casi sarà consigliabile utilizzare biomateriali a veloce riassorbimento, mentre in altri un lento riassorbimento potrebbe essere preferito.

Le caratteristiche ideali di uno scaffold per rigenerazione ossea sono le seguenti:

- Biocompatibilità/ Assenza di reazione infiammatoria
- Osteoconduzione
- Osteoinduzione
- Potenzialità Osteogenica
- Riassorbibilità/Velocità di riassorbimento

Biocompatibilità/Assenza di reazione infiammatoria

Ogni biomateriale che sia in commercio deve aver dimostrato buone caratteristiche di biocompatibilità. Tuttavia questo non significa che questi non inducano una risposta infiammatoria nella sede di innesto perciò si può affermare che il grado di biocompatibilità sia diverso tra diversi biomateriali. Molti dei biomateriali scaffold provengono da donatori umani o da altre specie animali, questo perché la composizione chimica del biomateriale è la più simile possibile alla composizione dell'osso nel sito ricevente e la reazione infiammatoria scaturita sarà inferiore. Alcuni biomateriali di sintesi mantengono una composizione chimica simile a questa. Altri materiali invece hanno composizione dissimile per cui possono stimolare una risposta infiammatoria maggiore. Nei casi in cui tale reazione avvenga in tessuti profondi questa potrebbe esaurirsi prima di creare reazioni avverse. Diversa è la situazione in cui tale reazione avvenga in prossimità dei tessuti superficiali dove un grado di infiammazione anche ridotto può aumentare la sofferenza del lembo e di conseguenza la possibilità di esposizione dell'innesto.

Osteoconduzione

L'osteoconduzione è la capacità di un materiale di permettere la formazione di nuovo osso sulla sua superficie. E' questa una condizione indispensabile dei biomateriali da

impalcatura e strettamente legata alla biocompatibilità: maggiore è la biocompatibilità di un biomateriale più veloce sarà l'osteocostruzione e cioè la formazione di matrice ossea sulla superficie delle particelle di biomateriale da parte delle cellule dell'ospite che ripopolano il difetto innestato.

Osteoinduzione

L'osteocostruzione è invece la capacità di un biomateriale di modificare il comportamento delle cellule dell'ospite privilegiando la moltiplicazione e la differenziazione delle cellule osteogeniche. Le cellule staminali mesenchimali presenti nel nostro corpo hanno la capacità di differenziarsi e formare diversi tessuti mesenchimali (adipe, cartilagine, osso, ecc.). La differenziazione è dettata dagli stimoli che provengono dall'ambiente circostante. Questo vuol dire che le stesse cellule possono formare osso se poste in un tessuto osteogenico, cartilagine o adipe se posti in prossimità di questi tessuti. Le cellule esposte ad uno stimolo osteoinduttivo si differenzieranno preferibilmente verso la linea osteogenica. È perciò possibile stimolare la formazione di osso anche in una sede lontana da altro tessuto osseo fornendo uno stimolo osteoinduttivo. Le proteine riconosciute come osteoinduttive sono le Proteine Morfogenetiche dell'Osso (BMP- Bone Morphogenic Proteins). Ci sono diverse famiglie di BMP con diverse capacità. In chirurgia ossea ricostruttiva e in parodontologia le più studiate sono le BMP-2, BMP-7 e BMP-12 (Ripamonti et al. 1996; Howell et al. 1997; Wikesjo et al. 2004; Wei et al. 2007). Dei biomateriali disponibili in commercio tutti i biomateriali deproteinizzati non contengono proteine e perciò non contengono BMP e non sono osteoinduttivi. Solo l'osso autologo e l'osso da donatore demineralizzato (ma non deproteinizzato) hanno capacità induttive (Urist 1965; Urist & Dowell 1968). Inoltre sono commercializzati prodotti di sintesi contenenti BMP ricombinanti che hanno capacità osteoinduttive.

Potenzialità Osteogenica

Sia i biomateriali osteoconduttivi che gli osteoinduttivi prevedono che il nuovo tessuto sia generato dalle cellule ospiti provenienti dal tessuto circostante l'innesto.

Un biomateriale con potenzialità osteogenica è invece in grado di formare attivamente nuovo osso. Questo deve perciò contenere cellule capaci di differenziarsi verso la linea osteogenica a partire dalle cellule osteoblasti che del paziente o a partire da altre linee cellulari eventualmente caricate pre o post-differenziamento in senso osteoblastico sullo scaffold. Attualmente i biomateriali caricati con le cellule di tipo staminale sono ancora in fase di ricerca e non sono utilizzabili nell'ambulatorio odontoiatrico. Alcuni biomateriali possono inoltre essere potenziati da fattori di crescita (vedi capitolo 3).

Riassorbibilità/Velocità di riassorbimento

La riassorbibilità e la velocità di riassorbimento di un biomateriale sono altre caratteristiche importanti. In difetti contenitivi sarebbe auspicabile il completo riassorbimento del biomateriale nel tentativo di ricostituire un tessuto il più possibile simile al tessuto originario. L'innesto dovrebbe perciò rimanere integro durante il periodo necessario alla formazione di nuovo osso e successivamente essere riassorbito e lasciare spazio a tessuto osseo neoformato. Innesti mineralizzati hanno riassorbimento più o meno veloce a seconda del grado di mineralizzazione dello stesso, mentre innesti non mineralizzati o demineralizzati hanno veloce riassorbimento. Sono inoltre disponibili innesti non riassorbibili come le scaglie di titanio.

Un possibile effetto avverso del riassorbimento del biomateriale è la perdita di volume dell'innesto. Per questo motivo in molti interventi che richiedano l'aumento di volume di una sede innestata si tende ad utilizzare biomateriali a lento o scarso riassorbimento. Maggiore è il grado di riassorbimento di un materiale, maggiore dovrà essere la sovra-correzione del difetto per ottenere un aumento di volume soddisfacente.

Al contrario, un vantaggio del riassorbimento veloce è l'esito di un'eventuale esposizione del biomateriale. Dovesse un biomateriale esporsi, il suo riassorbimento preverebbe il mantenimento di una via di ingresso per i batteri nella sede di innesto riducendo la possibilità di infezione dello stesso.

2.2. Principali biomateriali impalcatura per la rigenerazione ossea e parodontale.

Ossso autologo

L'osso autologo è stato ed è ampiamente utilizzato in medicina ed in odontoiatria. Dal punto di vista biologico questo è il miglior materiale disponibile poiché mantiene tutte le componenti organiche ed inorganiche dell'osso incluse cellule vitali già predisposte alla formazione di osso. Questo tipo di innesto è perciò osteogenetico, osteoconduttivo ed osteoinduttivo (Urist 1965, Burchardt 1983). A fronte dei vantaggi biologici va comunque considerato il costo biologico per il paziente sottoposto all'operazione di prelievo, l'aumento della morbidità, del tempo operatorio e delle possibilità di contaminazione dell'innesto.

Una volta innestato, la rivascolarizzazione sia con i vasi neoformati, che con anastomosi tra i vasi del sito ricevente e quelli dell'innesto, rendono possibile il mantenimento della vitalità dell'innesto. Questo processo è però strettamente dipendente dal tipo di prelievo utilizzato. Più il prelievo è meccanicamente processato, più viene meno la vitalità delle cellule e l'integrità della rete vascolare. Tuttavia anche se si utilizzasse un innesto osseo in blocco e questo si integrasse, la vitalità delle cellule in esso contenute non sarebbe scontata. Matsumoto nel 2002 ha infatti dimostrato l'assenza di osteociti nelle lacune osteocitarie di innesti in blocco soprattutto in caso di innesti da sedi extraorali (Matsumoto et al. 2002). Le reazioni immunologiche sono scongiurate con l'utilizzo di osso autologo (Piattelli 2003). All'esame istomorfometrico la percentuale di osso neoformato è mediamente del 42%, gli spazi midollari rappresentano il 40%, mentre l'osso autologo residuo rappresenta il 18%.

Innesti Xenogenici

Gli scaffold maggiormente utilizzati nel nostro paese per la rigenerazione ossea e parodontale sono gli innesti xenogenici. Per innesto xenogenico si intende un innesto di derivazione da una specie animale diversa dalla specie umana. Questi biomateriali

sono comunemente ottenuti da bovini, suini ed equini. Poiché la componente proteica del prodotto provocherebbe una reazione immunologica contro di questo una volta innestato, questi biomateriali devono subire un processo di deproteinizzazione e deantigenazione che rimuova ogni componente proteica come i trattamenti termici o l'utilizzo di soda caustica. I processi di deproteinizzazione potrebbero non essere totalmente efficaci anche nella eliminazione di prioni possibilmente causa di malattie quali l'encefalopatia spongiforme bovina e la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) (Honig et al. 1999; Lang et al. 2000). Per questo motivo alcune compagnie leader del settore utilizzano solo animali provenienti da paesi in cui queste malattie non siano mai state riscontrate e porzioni animali lontane dai tessuti midollari che normalmente accolgono i prioni portatori di queste malattie. Prodotti da aziende leader nel settore possono perciò essere considerati sicuri dal punto di vista della trasmissione di eventuali patologie al paziente innestato tanto che il paziente può essere considerato idoneo come donatore di sangue. Alcuni altri prodotti tuttavia potrebbero non avere la certificazione necessaria ed il paziente dovrebbe essere informato che potrebbe non essere considerato idoneo alla donazione. Ciò che rimane dopo il processo di deproteinizzazione è la componente minerale della matrice ossea sostanzialmente composta da fosfato e carbonato di calcio sotto forma di cristalli di apatite, organizzati in forma reticolare. Tale organizzazione favorisce sia la stabilizzazione del coagulo che l'apposizione di nuovo osso. Diversi produttori utilizzano metodiche di preparazione dell'innesto diverse, alterando in modo più o meno importante le caratteristiche di superficie del prodotto quali la bagnabilità e le caratteristiche biofisiche della superficie. Normalmente i biomateriali xenogenici sono disponibili sotto forma di particolato di spongiosa o di corticale con diverse granulometrie oppure sotto forma di blocchi spugnosi. La capacità osteoconduttiva degli xenoinnesti è stata valutata in numerosi lavori (Hurzeler et al. 1998; Hammerle & Lang 2001).

All'esame istomorfometrico la percentuale di osso neoformato è mediamente del 39%, gli spazi midollari rappresentano il 34% mentre il materiale residuo rappresenta

il 27% (Hurzeler et al. 1998; Piattelli 2003). Gli esami istologici a lungo termine dimostrano che la percentuale di biomateriale residuo trovato nelle biopsie a 6 mesi è sovrapponibile a quella rilevata nel medesimo soggetto dopo 3 anni (Hallman et al. 2001) o addirittura a 16 anni (Mordenfeld et al. 2010).

Innesti Allogenici

Disponibili attraverso le banche dell'osso sono i sostituti omologhi allogenici ovvero da donatore umano con patrimonio genetico diverso. Questi sostituti possono essere freschi, demineralizzati liofilizzati, deproteinizzati liofilizzati refrigerati.

L'essiccamento-congelamento riduce marcatamente l'antigenicità del tessuto. L'osso deproteinizzato dovrebbe mantenere una maggiore disponibilità di BMP. Tuttavia mentre alcuni autori sostengono che il materiale abbia caratteristiche propriamente osteoinduttive (Whittaker et al. 1989; Kubler et al. 1993), altri riferiscono un basso potenziale osteoinduttivo (Frost et al. 1982; Becker et al. 1995; Wetzel et al. 1995). Un eventuale rischio di infezione da HIV e da virus lenti è presente con questi biomateriali (casi di infezione da HIV sono stati dimostrati negli USA nel 1995) (Marx & Carlson 1991; Carlson et al. 1995); tuttavia le Banche dei tessuti hanno rigidi criteri di selezione dei donatori in modo da garantirne la qualità anche riguardo il rischio di trasmissione di malattie infettive. All'esame istomorfometrico la percentuale media di osso neoformato è il 29%, gli spazi midollari rappresentano il 37%, mentre le particelle di osso demineralizzato rappresentano il 34% (Piattelli 2003). La sostituzione da parte dell'osso autologo è lenta (Becker et al. 1995).

Innesti Alloplastici o Sintetici

I prodotti alloplastici sono prodotti di sintesi, costruiti in laboratorio e con caratteristiche teoricamente osteoconduttive che dovrebbero garantire la formazione di legami stabili nel tempo con l'osso neoformato (Bauer & Muschler 2000). Le bioceramiche hanno caratteristiche strutturali simili alla componente inorganica dell'osso, si legano con l'osso stesso seguendo una via naturale (Sasaoka et al. 1989). L'idrossiapatite è bioinerte e biocompatibile. Questo materiale svolge un ottimo ruolo

come riempitivo, ma non contribuisce in maniera significativa alla neoformazione ossea. All'esame istomorfometrico la percentuale di osso neoformato è 41%, gli spazi midollari rappresentano il 30%, mentre l'idrossiapatite residua rappresenta il 31% (Piattelli 2003). La riassorbibilità è lenta anche a distanza di tempo (Zinner & Small 1996; Piattelli 2003).

Il beta fosfato tricalcico una volta in situ viene completamente riassorbito in 6-9 mesi e sostituito da nuovo osso (Coetzee 1980). La sua funzione di osteoconduzione è stata dimostrata in difetti ossei ampi (Kodama et al. 1989). Durante il riassorbimento fornisce ioni Ca, Mg e fosfati al tessuto osseo creando una concentrazione ionica ideale che consente l'attivazione della fosfatasi alcalina, fondamentale per il processo di ossificazione (Irrigary 1987).

I biovetri sono costituiti da una ceramica vetrosa composta da silice (45%), ossido di sodio (24.5%), ossido di calcio (24.5%) e pentossido di fosforo. Questi materiali hanno ottime capacità osteoconduttive ma sono scarsamente riassorbiti a distanza di tempo. All'esame istomorfometrico la percentuale di osso neoformato è mediamente del 40%, gli spazi midollari rappresentano il 43%, mentre il biomateriale residuo rappresenta il 17% (Piattelli 2003).

Il corallo biologico è costituito principalmente da carbonato di calcio sotto forma di argonite o carbonato di calcio puro, stronzio, fluoruro, magnesio, sodio, potassio. Il biocorallo è un ottimo osteoconduttore e permette la crescita ossea sia per apposizione che per sostituzione (Chiroff et al. 1975; Guillemain et al. 1987; Martin et al. 1989). All'esame istomorfometrico la percentuale di osso neoformato è del 42%, gli spazi midollari rappresentano il 40%, mentre il biomateriale residuo rappresenta il 18% (Piattelli 2003). Il riassorbimento dello scheletro corallino avviene per opera dell'anidraasi carbonica degli osteoblasti.

La combinazione dei polimeri dell'acido lattico e dell'acido glicolico, forma biomateriali biocompatibili (Athanasίου et al. 1996) e biodegradabili. I prodotti di degradazione dei polimeri seppur potenzialmente tossici sono rilasciati lentamente ed in quantità tossicologicamente trascurabili. L'azione osteoconduttiva e la capacità di

favorire la rigenerazione di nuovo tessuto osseo sono state dimostrate in letteratura (Lundgren et al. 1992; Miyamoto & Takaoka 1993; Winet & Hollinger 1993). I tempi di riassorbimento variano tra i 4 e gli 8 mesi. All'esame istomorfometrico la percentuale di osso mineralizzato è del 43%, il biomateriale residuo rappresenta l'1%, mentre gli spazi midollari rappresentano il 56%. La degradazione ed il riassorbimento di questo biomateriale è relativamente lento.

2.3. La ricerca scientifica: verso i materiali stampabili

Buona parte delle difficoltà operatorie sono legate alle difficoltà relative alla stabilizzazione dell'innesto od alla capacità di mantenere un adattamento dell'innesto al sito ricevente. Per risolvere queste problematiche cliniche la ricerca scientifica si sta muovendo alla ricerca di biomateriali stampabili che possano essere adattati al difetto utilizzando gli esami strumentali, come la tomografia computerizzata *Cone Beam* (vedi capitolo 4), che permettono di creare un innesto in blocco precisamente adattabile al difetto in questione. Inoltre è possibile adattare la microstruttura interna del difetto con lo scopo di facilitare la neoangiogenesi, la penetrazione di cellule del tessuto circostante, l'effetto barriera, la diffusione dei nutrienti e rigenerazione guidata di tessuti diversi all'interno dell'innesto. Queste caratteristiche rientrano nella definizione di biomimetica e facilitano l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare che porteranno alla rigenerazione del nuovo tessuto (Seunarine et al. 2006). Il termine con cui vengono definiti questi innesti è "3D scaffolds" a sottolineare il disegno tridimensionale dello scaffold preadattato. Per una biomimesi ottimale è indispensabile un adeguato assorbimento superficiale di proteine che è legato alle caratteristiche di idrofobicità/idrofilicità, ed alle caratteristiche di rugosità, topografia superficiale, porosità e caratteristiche biomeccaniche del materiale (Dalby et al. 2007; Brammer et al. 2008; Angwarawong et al. 2011; Ayala et al. 2011).

Ci sono molti metodi di fabbricazione di composti 3D. Le tecniche tradizionali includono: particle leaching, gas foaming, freeze-drying, phase separation, fiber meshes/fiber bonding, melt molding and solution casting (Kinoshita & Maeda 2013).

Queste tecniche non permettono tuttavia un adeguato controllo della dimensione, geometria, interconnettività e uniformità della disposizione dei pori interni. Nuove metodiche quali l'electro-spinning e la self-assembly risolvono questi problemi ma sono complesse o non permettono adeguata resistenza meccanica finale. La tecnica solid free-form (SFF), conosciuta anche come rapid prototyping (RP) sembra essere la migliore delle tecniche disponibili. Questa può attuarsi mediante fused deposition modeling (FDM), selective laser sintering (SLS) o stereolitografia, ed è compatibile con materiali quali polimeri artificiali, ceramiche e metalli (Asa'ad et al. 2016).

I materiali con maggiori potenzialità in chirurgia orale e parodontale sono gli idrogeli, gli scaffold nanofibrosi, le nano-/microsfere e gli scaffold multifasici. Questi ultimi in particolare grazie alla possibilità di compartimentalizzare mostrano ottime prospettive in campo parodontale dove la formazione di più tessuti (PDL, osso alveolare e cemento) sono necessari.

Sebbene gli scaffold 3D possano essere utilizzati nella preservazione alveolare, rigenerazione della cresta orizzontale e verticale e rialzo del pavimento del seno mascellare la loro applicazione nella rigenerazione parodontale è per noi di particolare interesse.

Recentemente il gruppo di Park, Giannobile e collaboratori hanno disegnato scaffold tridimensionali compartimentalizzati in modo da promuovere specificamente la rigenerazione di osso e di legamento parodontale. Questi scaffold sono costruiti sulla base delle indagini strumentali basate sull'immagine del sito che deve essere trattato. La componente disegnata per la rigenerazione ossea è in policaprolattone e presenta una architettura interna trabecolata con pori comunicanti e fori per l'applicazione di fattori di crescita. La componente parodontale- in acido polilattico- poliglicolico- è costituita da cilindri con microcanali con una architettura tale da guidare la deposizione delle fibre ed è spessa 250 micron - la stessa larghezza del legamento parodontale umano. L'acido polilattico- poliglicolico è riassorbibile velocemente mentre il policaprolattone si riassorbe in tempi superiori ad un anno. La precisione di questi costrutti è mediamente del 96% di adaptation ratio. Negli studi animali

compiuti la rigenerazione ossea e parodontale ha avuto successo in diversi modelli murini (Park et al. 2012, 2014).

Questa tecnologia è stata applicata anche in un unico case report su paziente umano. Uno scaffold 3D è stato impiantato in un paziente affetto da parodontite aggressiva generalizzata che presentava un difetto con una anatomia particolarmente sfavorevole sul versante mesiale del dente 3.3. Lo scaffold è stato stabilizzato con pin riassorbibili in acido polilattico (Sonic Pin Rx, KLS Martin, Tuttlingen, Germany) ed è stato impregnato di fattore di crescita derivato dalle piastrine ricombinante (rhPDGF-BB, GEM 21s, Osteohealth, Shirley, NY, USA) e sangue venoso autogeno. L'innesto è rimasto coperto per oltre 12 mesi, mentre al 13° mese una porzione di questo ha perforato i tessuti molli causando l'infezione dell'innesto residuo. Un prelievo dell'innesto ha dimostrato presenza di nuovo osso in contatto con il policaprolattone anche se in proporzioni ancora ridotte (Rasperini et al. 2015). I risultati di questi studi sono incoraggianti per quanto riguarda la fattibilità di interventi che utilizzino scaffold 3D nella rigenerazione parodontale nella pratica clinica. Tuttavia dimostrano anche come maggiori studi siano necessari per testare materiali maggiormente biocompatibili ed osteoconduttivi che permettano un più veloce turnover dell'innesto ed un miglior risultato nel lungo termine.

3. Mediatori biologici proposti per la medicina rigenerativa dei tessuti parodontali

a cura di Claudia Dellavia

I recenti progressi della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale si basano sull'utilizzo di mediatori biologici veicolati nel sito da rigenerare attraverso scaffold biocompatibili. A differenza dei classici biomateriali utilizzati in associazione con le membrane, che hanno lo scopo di prevenire la migrazione epiteliale all'interno del difetto da rigenerare, i mediatori biologici recentemente proposti si prefiggono di regolare la risposta infiammatoria del sito e di stimolare la rigenerazione del tessuto

parodontale. I mediatori biologici includono fattori di crescita, cellule staminali e geni.

3.1. Fattori di crescita

I fattori di crescita sono proteine che vengono espresse nel tessuto durante la fisiologica attività di rimodellamento o in seguito ad un trauma e che guidano il comportamento cellulare in senso proliferativo e differenziativo. Tali fattori possono essere somministrati direttamente nel sito da rigenerare o essere caricati all'interno di biomateriali scaffold. Ad oggi i fattori di crescita sono disponibili a scopo di ricerca o di applicazione clinica in alcune nazioni, ma non in altre.

In parodontologia, tra i fattori di crescita proposti ci sono i derivati dello smalto (EMD), i fattori di crescita piastrinici (PDGF), le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), il fattore di crescita endoteliale (VEGF), il fattore di crescita e differenziazione 5 e il fattore di crescita trasformante (TGF). Diversi studi hanno valutato l'impatto di queste proteine nella guarigione della ferita parodontale sia in modelli animali che sull'uomo. Le BMP sono state scoperte circa 40 anni fa da Marshal R. Urist come una serie di proteine contenute nella matrice ossea che erano in grado di indurre la formazione del tessuto osseo (Urist et al. 1977). Tra le BMP, che sono circa 20, le BMP-2 e BMP-7 sono state approvate per l'uso clinico dalla Food and Drug Administration (FDA). Il loro utilizzo è consentito in particolari situazioni cliniche tra cui le procedure di incremento della cresta alveolare e di rialzo del seno mascellare (McKay et al. 2007). Diversi studi sulla procedura di rialzo del seno hanno riportato un consistente incremento nel guadagno di osso nei casi trattati con BMP-2. Inoltre una recente revisione sistematica della letteratura ha riportato la capacità di questa proteina di preservare il volume della cresta alveolare (Freitas et al. 2015). Riguardo gli effetti sul legamento parodontale, studi in vitro hanno osservato che BMP-2, -6, -7 sono in grado di regolare la proliferazione cellulare, la mineralizzazione tissutale, e la trascrizione di mRNA come espressione di geni associati al tessuto mineralizzato in cellule umane staminali derivanti dal legamento parodontale di terzi molari estratti (Hakki et al. 2014). Sono emersi quindi

interessanti prospettive per l'utilizzo di questi fattori di crescita nel campo della rigenerazione parodontale, tuttavia sono necessari ulteriori studi per validare questa applicazione.

Il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) gioca un ruolo essenziale nella riparazione del tessuto parodontale promuovendo la proliferazione delle cellule del legamento parodontale, dei fibroblasti, e dei cementoblasti (Khoshkam et al. 2015). Il PDGF umano nella sua forma ricombinante isotipo BB (rhPDGF-BB) è stato approvato dalla FDA per la rigenerazione ossea e parodontale ed è commercialmente disponibile negli Stati Uniti, mentre in Europa non è ancora disponibile (Nevins et al. 2009). Questo fattore di crescita è stato testato per il trattamento di difetti parodontali infraossei. Dati di uno studio clinico controllato randomizzato hanno dimostrato migliori risultati clinici e radiografici in difetti infraossei trattati con PDGF in combinazione con granuli di beta-tricalciofosfato rispetto ai siti trattati con solo beta-tricalciofosfato (Nevins et al. 2013).

Il fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGF-2) è un fattore importante nella guarigione delle ferite e durante l'angiogenesi. FGF-2 inibisce la differenziazione in senso osteogenico delle cellule del legamento parodontale (evitando l'anchilosi), mantenendo il loro potenziale di differenziazione in senso fibroblastico e aumentando la proliferazione cellulare (Pilipchuk et al. 2015). Nei paesi asiatici il FGF-2 è disponibile per la ricerca clinica ed è pertanto stato applicato in difetti parodontali dimostrando buone capacità di stimolazione nella guarigione parodontale e di inibizione dell'invasione del difetto parodontale da parte dell'epitelio sulcolare (Hosokawa et al. 2000; Takayama et al. 2001). In uno studio clinico per il trattamento di difetti infraossei, la rigenerazione parodontale e il riempimento osseo hanno mostrato risultati migliori in seguito al trattamento con FGF-2 rispetto al controllo (Kitamura et al. 2011). Una recente revisione sistematica e meta-analisi ha dimostrato che nel trattamento dei difetti parodontali infraossei, rispetto al gruppo controllo (trattato con solo carrier), i siti trattati con PDGF-BB hanno dimostrato un incremento del riempimento lineare del difetto (rigenerazione ossea osservata

radiograficamente) e del guadagno di attacco clinico, mentre i siti trattati con FGF-2 hanno dimostrato solo un incremento del riempimento lineare del difetto (Khoshkam et al 2015).

I derivati della matrice dello smalto (amelogenine, EMD) sono molecole bioattive introdotte per il trattamento dei difetti infraossei sull'uomo quasi 20 anni fa (Heijl 1997) e più recentemente per i difetti sovraossei (Di Tullio et al. 2013). Gli esperimenti guidati da Lars Hammarström hanno dimostrato che le amelogenine potevano agire come proteine rigenerative chiave in grado di promuovere la rigenerazione del cemento parodontale, con l'inserimento funzionalmente orientato di nuove fibre del legamento parodontale, e la formazione di nuovo osso alveolare (Rasperini et al. 2000, 2005). I lavori di Lars Hammarström hanno aperto la strada a una quantità enorme di pubblicazioni relative allo studio delle basi biologiche del funzionamento, oltre che all'uso clinico delle amelogenine. Questo prodotto è disponibile anche in Italia ed è utilizzato ormai da decenni nella rigenerazione parodontale. L'efficacia clinica di EMD per la rigenerazione parodontale dei difetti infraossei è stata recentemente revisionata, ed è risultato che le amelogenine ad oggi sono tra i migliori fattori proteici proposti per la rigenerazione parodontale (Miron et al. 2016, Sculean et al. 2015).

Nella terapia rigenerativa parodontale, l'applicazione di fattori di crescita proteici sembra apportare dei benefici sia clinici che istologici. Tuttavia questo approccio presenta dei limiti, legati al fatto che le proteine somministrate hanno un'emivita limitata, e che non è possibile esercitare un controllo sulla loro distribuzione temporale e spaziale. Per superare questi limiti è stata proposta la terapia genica (vedi paragrafo 3.3).

3.2. Terapia cellulare

La terapia cellulare prevede il trattamento di una patologia attraverso l'introduzione nell'organo o nel tessuto di nuove cellule. Per questo approccio sono stati utilizzati diversi tipi cellulari: le cellule somatiche (differenziate) e le cellule staminali. Ad oggi, a livello craniofacciale, la terapia cellulare è uno dei più avanzati metodi per

incrementare la risposta rigenerativa nel trattamento di traumi, patologie destruenti e difetti congeniti (Pagni et al. 2012). Le cellule somatiche possono essere raccolte, coltivate, e impiantate direttamente nel sito di distruzione dei tessuti. I fibroblasti del legamento parodontale, i cementoblasti, e le cellule del follicolo dentale mostrano tutte la capacità mineralizzante in vitro e sono in grado di promuovere la rigenerazione parodontale. Tuttavia, le cellule somatiche perdono la capacità di autorinnovamento e il potenziale differenziativo caratteristico delle cellule staminali. Le cellule staminali possono essere raccolte da diversi siti, tra cui il midollo osseo, il tessuto adiposo, la polpa dentale e il legamento parodontale. Nella medicina rigenerativa dei difetti craniofacciali sono stati impiegati entrambi i tipi cellulari. Inoltre recentemente è stato proposto un approccio terapeutico che combina terapia cellulare e genica per la produzione sotto induzione di cellule staminali pluripotenti (iPSCs). In particolare, in questo approccio, attraverso la terapia genica le cellule somatiche vengono riprogrammate a cellule multipotenti o pluripotenti, per arrivare a formare una popolazione omogenea di cellule differenziate specifiche per ciascun paziente. Ci sono tuttavia ancora una serie di problemi riguardanti l'uso di iPSCs, tra cui la possibile integrazione dei geni del virus nell'ospite, la risposta immunogenica e una potenziale induzione alla formazione di tumori (Hong et al. 2014). Un esempio di applicazione di questa tecnica è la produzione di cellule di riparazione dell'osso, chiamate anche ixmylocel-T. Queste cellule vengono prodotte attraverso l'espansione selezionata di due tipi "chiave" di cellule mononucleari prelevate dal midollo osseo dei pazienti: CD90+ mesenchimali ed i macrofagi attivati autofluorescenti CD45+ CD14+. Questo metodo permette di produrre nel singolo paziente cellule specifiche in grado di incrementare la formazione di osso e di accelerare l'osteogenesi precoce (Kaigler et al. 2015). La terapia cellulare con ixmylocel-T è stata applicata in studi clinici di fase I/II, dove 24 pazienti che necessitavano di un trattamento per la rigenerazione dell'osso alveolare sono stati assegnati in modo randomizzato al gruppo controllo (rigenerazione ossea con spugna di gelatina) o al gruppo test (rigenerazione ossea con spugna di gelatina imbevuta di

ixmyelocel-T). Dopo 6-12 settimane di guarigione sono state prelevate ed analizzate delle biopsie ossee provenienti dai siti trattati. L'analisi ha dimostrato che nel gruppo test, già a 6 settimane l'osso rigenerato era più denso, altamente vascolarizzato e maturo. Questo studio ha quindi mostrato che questa tecnica per il trattamento dei difetti ossei è sicura e permette di incrementare la formazione di tessuto osseo (Kaigler et al. 2015). Bisogna tuttavia considerare che questa terapia cellulare che utilizza ixmyelocel-T è costosa, richiede il prelievo di cellule midollari dalla cresta iliaca e necessita di tempo per espandere le cellule prima del loro utilizzo (12-14 giorni) (Pagni et al. 2012).

Recentemente è stato proposto un altro tipo cellulare, di derivazione dal periostio, per la rigenerazione ossea attraverso terapia cellulare. Il periostio infatti è più accessibile del midollo osseo e il suo prelievo è meno invasivo per il paziente. In questa tecnica, cellule coinvolte nella rigenerazione parodontale vengono isolate dal periostio e poi coltivate su delle placche. Quando lo strato di cellule è formato, può essere impiantato nel difetto. Studi preclinici hanno dimostrato un'aumentata cementogenesi e rigenerazione delle fibre del legamento parodontale con l'utilizzo di queste membrane cellulari (Lin et al. 2015).

3.3 Terapia genica

La terapia genica si propone di superare i limiti di un controllo ridotto sulla distribuzione temporale e spaziale dei fattori di crescita, utilizzando delle cellule modificate geneticamente in modo che esse rilascino dosi specifiche di una proteina per un periodo di tempo prolungato. Esistono differenti metodi per trasferire alle cellule il gene di interesse o per interferire con l'espressione cellulare di un particolare gene. È infatti possibile trasferire al nucleo cellulare i plasmidi, ovvero piccole strutture circolari di DNA che non vengono incorporate nei cromosomi e che per questo sono ritenuti più sicuri, anche se hanno un effetto più transitorio. Anche gli adenovirus sono stati utilizzati per inserire geni nel nucleo delle cellule, senza che essi vengano integrati nel cromosoma. In studi preclinici sono stati trasferiti a cellule, attraverso questi virus, i geni di diverse proteine (BMP-7, PDGF-B) per il trattamento

di difetti ossei e parodontali. I risultati hanno mostrato dati interessanti e favorevoli sulla rigenerazione ossea, l'osteointegrazione degli impianti e la rigenerazione parodontale. Gli studi hanno inoltre mostrato che questa tecnica è sicura per un possibile utilizzo sull'uomo (Larrson et al. 2016). I virus adeno-associati (AAV) hanno una singola elica di DNA e quindi richiedono la DNA-polimerasi dell'ospite per completare la doppia elica. Questi virus permettono un efficiente trasferimento genico e un'espressione genica prolungata. In uno studio preclinico, gli AAV sono stati utilizzati per veicolare il gene di una immunoglobulina legante il fattore di necrosi tumorale nel trattamento della parodontite indotta da *Porphyromonas gingivalis*. Lo studio ha dimostrato che questo trattamento rallentava la progressione della parodontite e preveniva il riassorbimento dell'osso alveolare (Cirelli et al. 2009). Oltre ad utilizzare diversi mezzi per veicolare i geni nella cellula, la terapia genica prevede diverse modalità di rilascio. Le cellule target possono essere modificate geneticamente direttamente nel sito da trattare, attraverso per esempio l'applicazione diretta di virus nel tessuto. In alternativa le cellule, dopo essere state prelevate, possono essere modificate geneticamente in laboratorio e successivamente reintrodotte nel sito. Infine è possibile una somministrazione sistemica (Larrson et al. 2016). Nel campo parodontale, le cellule target della terapia genica possono essere i cementoblasti, le cellule del legamento parodontale, i fibroblasti e le cellule endoteliali. Gli effetti locali della terapia sono diversi, dalla migrazione cellulare, alla proliferazione, differenziazione e sintesi di matrice extracellulare.

4. Tecnologia Cone Beam Computed Tomography

a cura di Piero Casavecchia

L'esame radiografico standard in parodontologia è costituito da una serie di radiografie endorali, senza le quali non può essere correttamente stabilita l'indicazione alla terapia non chirurgica e chirurgica (SIDP 1998). Tuttavia le immagini fornite dalle radiografie tradizionali sono bidimensionali (2D) e la valutazione dei difetti infraossei (IBD), del coinvolgimento delle forcazioni degli

elementi pluriradicolarati (FI), della lamina dura e del livello osseo crestale sono limitate dalle proiezioni geometriche e dalla sovrapposizione di altre strutture anatomiche. Ci sono dati consistenti che dimostrano che difetti a cratere o localizzati lingualmente non possono essere diagnosticati correttamente (Ramadan & Mitchell 1962) e che la distruzione dell'osso vestibolare può non essere diagnosticata o può risultare indistinguibile dai difetti linguali (Rees et al. 1971). Ulteriori studi che paragonano radiografie a misurazioni prechirurgiche sono giunti alla conclusione che la perdita ossea può essere sottostimata di 1.5 mm, con ampia variabilità fra gli operatori (Eickholz & Hausmann 2000). Di conseguenza le radiografie tradizionali rimangono uno strumento diagnostico limitato (Hirschmann 1987). Questi limiti possono essere superati con l'utilizzo di tecniche diagnostiche tridimensionali (3D) come la Tomografia Computerizzata Cone Beam (CBCT) che rappresenta nel campo della radiologia dentale e maxillo-facciale una tecnologia nuova destinata a diffondersi ampiamente nei prossimi anni sia perché consente di ottenere immagini 3D di alta qualità con erogazione di dose al paziente generalmente inferiore a quella della tomografia computerizzata convenzionale, sia perché è accessibile, oltre che dal radiologo, dal dentista che può detenere e usare, seppure con i limiti stabiliti dalla legge, gli apparecchi radiologici dedicati.

I radiografici Cone Beam si differenziano da quelli usati per la tomografia computerizzata convenzionale (CT o MSCT) perché emettono fasci di raggi X che hanno la forma conica anziché a ventaglio. La CBCT fornisce poi ricostruzioni assiali, coronali, sagittali e multiplanari delle immagini senza ingrandimenti o distorsioni. Le immagini multiplanari possono essere ispessite aumentando il numero dei voxel adiacenti ed è possibile tramite l'uso di software dedicati, anche una ricostruzione 3D delle strutture dento-maxillo-facciali e la loro stampa. Inoltre i software delle unità CBCT sono dotati di filtri che consentono di ridurre il disturbo dell'immagine che si verifica quando si applica una dose radiante bassa.

La CBCT, come tutte le indagini radiologiche, richiede l'utilizzo di radiazioni ionizzanti che, se usate indiscriminatamente, possono essere dannose per l'essere

umano. La collimazione del fascio di raggi X all'area di interesse minimizza la dose di radiazione. La dose di radiazioni e il rischio connesso alla CBCT sono generalmente più alti di una radiografia endorale e di una panoramica, ma molto più bassi di una CT convenzionale a scopo diagnostico.

L'uso corretto delle apparecchiature Cone Beam deve tener conto di diversi aspetti come la differenza tra dose emessa e dose assorbita, l'influenza dei kV e dei mA sull'immagine da elaborare e sulla dose di radiazioni, l'importanza del posizionamento del paziente durante l'acquisizione volumetrica e l'esistenza di apparecchi diversi con caratteristiche diverse, l'informazione utile contenuta nell'immagine, la differenza tra l'estetica dell'immagine e il contenuto dell'immagine. Oltre ai parametri di esposizione, rivestono primaria importanza, per la dose al paziente, la grandezza del volume e l'angolo di acquisizione. I volumi che possono essere acquisiti hanno dimensioni diverse, variabili da apparecchio ad apparecchio. La tecnica per immagini deve tenere conto del principio di giustificazione e di ottimizzazione, ALARA (As Low As Reasonably Achievable), che raccomanda di conseguire tutte le informazioni necessarie ai fini diagnostico terapeutici utilizzando, però, la minor quantità possibile di dose radiante e di costi economici per raggiungere l'obiettivo rappresentato dalla salute del paziente (ICRP 2007). La maggior parte delle unità CBCT offrono la possibilità di acquisire campi visivi (Field of View-FOV) di diverse dimensioni. Ci sono apparecchi Cone Beam in grado di acquisire piccoli volumi, cioè con FOV che inglobano solo la regione dento-alveolare, apparecchi con FOV grandi che inglobano la regione cranio facciale e infine apparecchi con FOV misti. L'uso di piccoli FOV abbassa la dose di radiazione effettiva. Inoltre c'è evidenza che la dose radiante emessa dalla CBCT è marcatamente ridotta rispetto alla CT tradizionale (Mozzo et al. 1998, Schulze et al. 2004). Paragonando l'esposizione cutanea della CT tradizionale ad una esposizione di un FOV di piccole dimensioni di una CBCT, Honda et al. (2001) hanno riportato

una riduzione delle radiazioni da 160 a 1.19 mSv. Studiando l'esposizione del distretto maxillo-facciale, (Scaf et al. 1997) hanno riportato una esposizione alle radiazioni di 1.031 mSv per il mascellare superiore e 2.426 mSv per la mandibola usando CT tradizionale. Questi dati sono paragonati ad una irradiazione degli organi da parte della CBCT di 0.037 mSv mentre quelli di una ortopantomografia sono di 0.022 mSv (Ludlow et al. 2003) e di 0.15 mSv per una serie completa di radiografie endorali (Honda et al. 2001). Dunque si può affermare che la dose di radiazioni di una CBCT è fino a 15 volte inferiore a quella di una TC convenzionale (Kitagawa et al. 2003). Studi recenti riportano che la dose di radiazioni emessa dalla CBCT è dalle 4 alle 15 volte superiori a quella di una immagine panoramica standard ed equivalente alla dose emessa durante l'esecuzione di un esame radiografico endorale costituito mediamente da 18-22 radiografie (Avendanio et al. 1996; Dula et al. 2015). Pertanto l'uso della CBCT e i suoi potenziali rischi e benefici devono essere considerati con cura seguendo il principio di giustificazione e di ottimizzazione secondo il principio ALARA in ogni singolo caso.

4.1 La Cone Beam Computed Tomography (CBCT) per la diagnosi parodontale dei difetti ossei e di forcazione

L'aumento della profondità di sondaggio (PPD) è frequentemente in relazione alla presenza di difetti infraossei (angolari) che, quando non trattati, vanno incontro a peggioramento e compromettono la prognosi dell'elemento dentario (Papanou & Tonetti 2000). I risultati degli studi clinici hanno dimostrato che il trattamento chirurgico parodontale tramite varie modalità, come lembi di accesso per la chirurgia conservativa o innesti di vari tipi di biomateriali per la chirurgia ricostruttiva, possono esitare in una riduzione della profondità di sondaggio con riempimento radiografico del tessuto duro ed eliminazione della componente infraossea del difetto (Kao et al. 2015). E' anche stato dimostrato che il riempimento dei difetti ossei

dipende fortemente dalla anatomia del difetto stesso (difetti di tipo contenitivo a 2-3 pareti hanno un potenziale rigenerativo maggiore di difetti con una sola parete ossea residua). Quindi per migliorare il risultato clinico si raccomanda che la tecnica chirurgica che viene utilizzata e la scelta del biomateriale siano basate su una analisi accurata della anatomia preoperatoria del difetto (Hägi et al. 2014). Quando si sceglie di utilizzare una metodica rigenerativa, la diagnosi preparatoria e la valutazione dei risultati vengono fatti tradizionalmente attraverso il sondaggio del solco gengivale, l'esecuzione di radiografie periapicali e il sondaggio osseo (bone sounding) fatto sotto anestesia. Poiché il sondaggio parodontale dipende fortemente da vari fattori come il grado di infiammazione dei tessuti, il tipo e il diametro della sonda parodontale, la sua angolazione e la forza esercitata dall'operatore, i valori rilevati potrebbero sovra o sottostimare la reale profondità del difetto osseo (Listgarten 1980). Le radiografie periapicali forniscono una immagine bidimensionale (2D), sono difficili da standardizzare, possono avere proiezioni differenti e potrebbero sottostimare la profondità e la conformazione anatomica del difetto osseo (Eickholz & Hausmann 2000). Perciò vi è la necessità di adottare metodi di indagine per diagnosticare accuratamente l'anatomia dei difetti infraossei e per poter ottimizzare il piano di trattamento e raggiungere risultati più predicibili con la chirurgia rigenerativa.

Il paragone fra CBCT, radiografie periapicali e misurazioni dirette dei difetti ossei è stato fatto da Misch e coll nel 2006 (Misch et al. 2006): difetti infraossei artificiali sono stati creati su mandibole di crani umani e misurati con queste modalità usando un calibro elettronico. Le misure rilevate per ogni difetto erano tre: 1) la distanza dalla giunzione amelo-cementizia (CEJ) alla base del difetto osseo 2) la distanza dalla CEJ alla cresta alveolare adiacente al difetto osseo e 3) la larghezza del difetto. I difetti vennero poi riempiti con materiale da impronta e misurati in altezza e larghezza con un calibro elettronico. Le misurazioni lineari non rivelarono differenze

statisticamente significative fra il bone sounding, la radiografia periapicale e la CBCT per quanto riguarda i difetti interprossimali. La CBCT si è rivelata invece superiore alle radiografie 2D nella diagnosi dei difetti vestibolari e linguali: tutti i difetti venivano identificati con la CBCT, ma solo il 67% di essi venivano diagnosticati con la radiografia poiché i difetti vestibolari e linguali non sono visibili con l'immagine bidimensionale.

Questi dati sono paragonabili a quelli ricavati da un altro studio su mandibole di cadavere (Fuhrmann et al. 1997) in cui venivano paragonate radiografie a immagini ottenute con CBCT e rivelavano che solo il 60% dei difetti infraossei venivano identificati sulle radiografie mentre il 100% potevano essere diagnosticati usando CBCT.

La radiografia intraorale digitale (CCD) è stata paragonata alla CBCT per valutare la perdita ossea parodontale in uno studio su crani umani ottenuti da cadavere (Vandenbergh et al. 2007). La CBCT si è rivelata superiore alla radiografia digitale nella diagnosi e misurazione dei crateri infraossei, delle fenestrazioni e del coinvolgimento delle biforcazioni, mentre la radiografia digitale aveva un migliore contrasto, e una migliore definizione della qualità ossea e della lamina dura.

Uno studio fatto su mandibole umane e animali (Mengel et al. 2005) ha paragonato la misurazione dei difetti parodontali (fenestrazioni, deiscenze e forcazioni) fatta con radiografie periapicali, panoramiche, CT convenzionale e CBCT ai corrispondenti preparati istologici, riscontrando la superiorità della CBCT nella diagnosi dei difetti e nella qualità dell'immagine rispetto alle altre metodiche indagate. Sono state inoltre dimostrate corrispondenze fra i dati CBCT e i riscontri clinici per quanto riguarda la misura dell'altezza della cresta alveolare, la guarigione e il riempimento del difetto osseo (de Faria Vasconcelos et al. 2012; Grimard et al. 2009).

Una buona accuratezza in termini di misurazioni lineari e volumetriche per la CBCT è stata confermata anche in diversi studi eseguiti in vitro (Misch et al. 2006).

Un paragone fra misurazioni cliniche, radiografie endorali digitali e CBCT del cambiamento dei livelli ossei dopo terapia rigenerativa è stato fatto da Grimard et al. (2009). Radiografie digitali e immagini CBCT sono state effettuate in 35 difetti infraossei prima della terapia rigenerativa e 6 mesi dopo, al momento della chirurgia di rientro. La misurazione dei difetti è stata eseguita intraoperatoriamente e paragonata alle misurazioni ottenute dalle immagini radiografiche. La correlazione fra le misurazioni chirurgiche e le immagini CBCT era molto forte, mentre era meno favorevole per le radiografie digitali. Le radiografie digitali sottostimavano il difetto di 1.5 mm al momento preoperatorio e 0.6 mm al momento del rientro chirurgico, mentre la CBCT era molto più precisa, rivelandosi un metodo attendibile per evitare in futuro rientri chirurgici per definire i risultati della terapia rigenerativa.

La CBCT è stata applicata in vivo per la diagnosi del coinvolgimento delle biforcazioni dei molari superiori e il relativo piano di trattamento chirurgico (Walter et al. 2010). Le rilevazioni cliniche includevano il sondaggio parodontale con la rilevazione della PD e del CAL e il sondaggio delle biforcazioni tramite sonda curva in tre siti (mesiopalatino, vestibolare, distopalatino). I difetti venivano poi classificati usando la classificazione di Hamp (Hamp et al. 1975). Le immagini radiografiche venivano rilevate con pellicole tradizionali e standardizzate con centratori di Rinn. L'immagine CBCT veniva eseguita solo nella zona interessata usando un FOV piccolo. Più del 50% delle misurazioni fatte clinicamente e con radiografie endorali sottostimavano il coinvolgimento delle biforcazioni se paragonate alla CBCT.

Inoltre la CBCT consentiva di rilevare anche variazioni anatomiche come la fusione di radici o la prossimità radicolare, la presenza di lesioni periapicali o lesioni combinate endo-parodontali, la valutazione del trattamento endodontico pre-esistente e la presenza del secondo canale mesiovestibolare (Walter et al. 2011).

I fattori che influenzano la prognosi dei molari con coinvolgimento delle biforcazioni sono molteplici:

- grado di coinvolgimento della biforcazione e percentuale di perdita ossea iniziale;
- indice di placca totale (FMPS) e indice di sanguinamento totale (FMBS);
- fattori relativi alla dentizione, come numero di denti mancanti e molari residui (Dannewitz et al. 2006);
- fattori relativi al paziente come fumo, malattie sistemiche e parafunzioni e il tipo di trattamento (Hirschfeld & Wasserman 1978, Al-Shammari et al. 2001).

I molari gravemente compromessi con coinvolgimento delle biforcazioni hanno un rischio maggiore di una ulteriore perdita di attacco verticale ed orizzontale, che può peggiorare la prognosi dell'elemento dentario e portare alla perdita del dente. E' ampiamente riportato in letteratura che i molari rispondono in maniera meno favorevole rispetto ai denti monoradicolti alla terapia non-chirurgica (Nordland et al. 1987, Loos et al. 1989). Inoltre è stato dimostrato che una profondità di sondaggio (PPD) uguale o maggiore a 6 mm necessita di ulteriore terapia per ridurre od eliminare la progressiva perdita di attacco. Quindi in questi molari in particolare vi è la necessità, per selezionare il trattamento chirurgico, di una diagnosi accurata che comprenda la valutazione della componente ossea residua, il grado di coinvolgimento della biforcazione in senso orizzontale e verticale, la quantità di osso interradicolare e periradicolare, e la valutazione della morfologia radicolare. La diagnosi clinica basata sulla profondità di sondaggio, sul livello di attacco clinico e sul sondaggio dell'entrata della biforcazione è spesso limitata dalla difficoltà di accesso, variazioni morfologiche ed errori di misurazione (Kalkwarf & Reinhardt 1988).

Uno studio successivo (Walter et al. 2010) ha paragonato le misurazioni intraoperatorie di 25 molari superiori con coinvolgimento delle biforcazioni sottoposti a chirurgia con immagini derivati da esame CBCT. L'84% dei dati rilevati con CBCT sono stati confermati intraoperatoriamente, nel 14.7% sei siti vi era una sottostima radiografica e solo nell'1.3% dei casi (1 sito) la CBCT sovrastimava

l'analisi chirurgica. La coincidenza fra le rilevazioni era maggiore nell'ingresso della biforcazione disto-palatina, seguita dalla vestibolare e dalla mesio-palatina.

L'uso della CBCT consente dunque un piano di trattamento più accurato e facilita il processo decisionale sul tipo di trattamento chirurgico. Per la chirurgia resettiva dei molari superiori la CBCT indica chiaramente le radici che possono essere mantenute e quelle che devono essere eliminate, limitando il trattamento endodontico preoperatorio solo alle radici che possono essere mantenute e quindi il costo economico ed il disagio per il paziente.

Sebbene, alcune analisi preliminari abbiano dimostrato una possibile riduzione dell'invasività, dei tempi e dei costi del trattamento (Walter et al. 2012), ad oggi non sono ancora disponibili dati a lungo termine sul beneficio dell'uso della CBCT nella chirurgia dei molari superiori con una reale stima dei costi biologici ed economici.

5. Conclusioni

L'attuale evidenza scientifica sembra supportare le seguenti conclusioni:

- l'applicazione di scaffolds per la rigenerazione dei difetti ossei parodontali presenta numerose complessità operatorie legate principalmente alla difficoltà nella stabilizzazione dell'innesto e nell'adattamento dello scaffold al sito ricevente.

Pertanto sono oggetto di studio biomateriali personalizzati sul difetto del paziente che vengano preparati con tecnologie moderne quali le stampanti 3D a partire dai dati anatomici acquisiti con le nuove tecniche radiologiche come la CBCT;

- vi sono attualmente numerosi fattori di crescita risultati efficaci per la rigenerazione parodontale, ma di questi gli unici con ampia letteratura disponibili per l'utilizzo clinico in Italia sono le amelogenine;

- gli studi hanno mostrato che la tecnica di trasferimento di plasmidi contenenti geni di diverse proteine al nucleo delle cellule del paziente sia sicura per un possibile utilizzo sull'uomo per il trattamento di difetti ossei e parodontali, ma ad oggi si è ancora in fase di sperimentazione analogamente alla determinazione delle migliori

fonti di cellule staminali;

- nonostante i numerosi dati scientifici a supporto delle applicazioni dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa in parodontologia si raccomanda prudenza nell'approcciarsi a tecniche e biomateriali che non siano ancora stati adeguatamente testati;

- la CBCT fornisce immagini molto accurate per la determinazione della morfologia di difetti infraossei e interradicolari che possono aiutare il parodontologo nella diagnosi preoperatoria;

- la CBCT ha dimostrato vantaggi in particolare nella pianificazione di trattamenti chirurgici complessi con coinvolgimento delle forcazioni dei molari superiori;

-ulteriori studi sono necessari per determinare i benefici dell'uso della CBCT per la diagnosi ed il trattamento dei difetti infraossei e interradicolari, considerando l'alto dosaggio di radiazioni emesso e il rapporto costo-beneficio. Pertanto l'utilizzo *routinario* della CBCT in parodontologia non è ad oggi raccomandato.

6. Bibliografia

- Al-Shammari, K.F., Kazor, C.E. & Wang, H.L. (2001) Molar root anatomy and management of furcation defects. *Journal of Clinical Periodontology* 28:730-740.
- Angwarawong, T., Dubas, S.T., Arksornnukit, M. & Pavasant, P. (2011). Differentiation of MC3T3-E1 on poly (4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid) sodium salt-coated films. *Dental Materials Journal* 30(2): 158-169.
- Asa'ad, F., Pagni, G., S. Pilipchuk, A., Gianni, W., Giannobile, W., and Rasperini, G. (2016). Three Dimensional Scaffolds & Biomaterials: A Review for Applications in Alveolar Bone Augmentation & Periodontal Regeneration. *International journal of dentistry*. E-pub, doi: 10.1155/2016/1239842. Review.
- Athanasiou, K.A., Niederauer, G.G. & Agrawal, C.M. (1996) Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17(2): 93-102.
- Avendanio, B., Frederiksen, N.L., Benson, B.W. & Sokolowski, T.W. (1996) Effective dose and risk assessment from detailed narrow beam radiography. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 82:713-719.
- Ayala, R., Zhang, C., Yang, D., Hwang, Y., Aung, A., Shroff, S.S., Arce, F.T., Lal, R., Arya, G. & Varghese, S. (2011) Engineering the cell-material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation. *Biomaterials* 32(15): 3700-3711.
- Bauer, T.W. & Muschler, G.F. (2000) Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (371): 10-27.
- Becker, W., Schenk, R., Higuchi, K., Lekholm, U. & Becker, B.E. (1995) Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. *International journal of oral and maxillofacial implants* 10(2): 143-154.
- Brammer, K.S., Oh, S., Gallagher, J.O. & Jin, S. (2008) Enhanced cellular mobility guided by TiO₂ nanotube surfaces. *Nano Letters* 8(3): 786-793.

- Burchardt, H. (1983) The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (174): 28-42.
- Carlson, E.R., Marx, R.E. & Buck, B.E. (1995) The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 80(1): 17-23.
- Chiroff, R.T., White, E.W., Weber K.N. & Roy D.M. (1975) Tissue ingrowth of Replamineform implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 9(4): 29-45.
- Cirelli, J.A., Park, C.H., MacKool, K., Taba, M. Jr, Lustig, K.H., Burstein, H. & Giannobile, W.V. (2009) AAV2/1-TNFR:Fc gene delivery prevents periodontal disease progression. *Gene Therapy* 16(3): 426-436.
- Coetzee, A.S. (1980) Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate. *Archives of Otolaryngology* 106(7): 405-409.
- Dalby, M.J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M.O., Herzyk, P., Wilkinson, C.D. & Oreffo, R.O. (2007) The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials* 6(12): 997-1003.
- Dannewitz, B., Krieger, J.K., Husing, J. & Eickholz, P. (2006) Loss of molars in periodontally treated patients: a retrospective analysis five years or more after active periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology* 33: 53-61.
- de Faria Vasconcelos, K., Evangelista, K.M., Rodrigues, C.D., Estrela, C., de Sousa, T.O. & Silva, M.A. (2012) Detection of periodontal bone loss using cone beam CT and intra- oral radiography. *Dentomaxillofacial Radiology* 41, 64-69.
- Di Tullio, M., Femminella, B., Pilloni, A., Romano, L., D'Arcangelo, C., De Ninis, P. & Paolantonio, M. (2013) Treatment of supra-alveolar-type defects by a simplified papilla preservation technique for access flap surgery with or without enamel matrix proteins. *Journal of Periodontology* 84(8): 1100-1110.
- Dula, K., Benic, G., Bornstein, M. et al. (2015) SADMFR Guidelines for the Use of Cone- Beam Computed Tomography / Digital Volume Tomography. A consensus

- workshop organized by the Swiss Association of Dentomaxillofacial Radiology. Part II: Endodontics, Periodontology, Reconstructive Dentistry, Pediatric dentistry. Swiss Dental Journal 125(9): 945-53.
- Eickholz, P. & Hausmann, E. (2000) Accuracy of radiographic assessment of interproximal bone loss in intrabony defects using linear measurements. European Journal of Oral Sciences 108:70-73.
- Freitas, R.M., Spin-Neto, R., Marcantonio, E. Jr, Pereira, L.A., Wikesjö, U.M. & Susin, C. (2015) Alveolar ridge and maxillary sinus augmentation using rhBMP-2: a systematic review. Clinical Implant Dentistry and Related Research 17 Suppl 1:e192-201.
- Frost, D.E., Fonseca, R.J. & Burkes, E.J. Jr. (1982) Healing of interpositional allogeneic lyophilized bone grafts following total maxillary osteotomy. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 40(12): 776-786.
- Fuhrmann, R.A., Bucker, A. & Diedrich, P.R. (1997) Furcation involvement: comparison of dental radiographs and HR-CT-slices in human specimens. Journal of Periodontal Research 32, 409-418.
- Grimard, B.A., Hoidal, M.J., Mills, M.P., Mellonig, J.T., Nummikoski, P.V. & Mealey, B.L. (2009) Comparison of clinical, periapical radiograph, and cone-beam volume tomography measurement techniques for assessing bone level changes following regenerative periodontal therapy. Journal of Periodontology 80: 48-55.
- Guillemin, G., Patat, J.L., Fournie, J. & Chetail, M. (1987) The use of coral as a bone graft substitute. Journal of Biomedical Materials Research 21(5): 557-567.
- Hägi, T.T., Laugisch, O., Ivanovic, A. & Sculean, A. (2014) Regenerative periodontal therapy. Quintessence International 45, 185-192.
- Hakki, S.S., Bozkurt, B., Hakki, E.E., Kayis, S.A., Turac, G., Yilmaz, I. & Karaoz, E. (2014) Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials 102(1): 119-130.

- Hallman, M., Lundgren, S. & Sennerby, L. (2001) Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 3(2): 87-96.
- Hammerle, C.H. & Lang, N.P. (2001) Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clinical Oral Implants Research* 12(1): 9-18.
- Hamp, S.E., Nyman, S. & Lindhe, J. (1975) Periodontal treatment of multirrooted teeth. Results after 5 years. *Journal of Clinical Periodontology* 2, 126-135.
- Heijl, L. (1997) Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *Journal of Clinical Periodontology* 24 (9 Pt 2): 693-696.
- Hirschfeld, L. & Wasserman, B. (1978) A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *Journal of Periodontology* 49: 225-237.
- Hirschmann, P.N. (1987) Radiographic interpretation of chronic periodontitis. *International Dentistry Journal* 37: 3-9.
- Honda, K., Arai, Y., Iwai, K., Hashimoto, K., Saitou, T. & Shinoda, K. (2001) Fundamental efficiency of new-style limited cone-beam CT (3DX): Comparison with helical- CT. *Japanese Journal of Tomography* 27: 193-198.
- Hong, S.G., Winkler, T., Wu, C., Guo, V., Pittaluga, S., Nicolae, A., Donahue, R.E., Metzger, M.E., Price, S.D., Uchida, N., et al. (2014) Path to the clinic: assessment of iPSC-based cell therapies in vivo in a nonhuman primate model. *Cell Reports* 7(4):1298-1309.
- Honig, J.F., Merten H.A. & Heinemann D.E. (1999) Risk of transmission of agents associated with Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Plastic and Reconstructive Surgery* 103(4): 1324-1325.
- Hosokawa, R., Kikuzaki, K., Kimoto, T., Matsuura, T., Chiba, D., Wadamoto, M., Sato, Y., Maeda, M., Sano, A. & Akagawa, Y. (2000) Controlled local application

of basic fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates the healing of GBR. An experimental study in beagle dogs. *Clinical Oral Implants Research* 11(4): 345-353.

Howell, T.H., Fiorellini, J., Jones, A., Alder, M., Nummikoski, P., Lazaro, M., Lilly, L. & Cochran, D. (1997) A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 17(2): 124-139.

Hurzeler, M.B., Kohal, R.J., Naghshbandi, J., Mota, L.F., Conradt, J., Hutmacher, D. & Caffesse, R.G. (1998) Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 27(4): 315-320.

International Commission on Radiological Protection. (2007) Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann ICRP 37, Oxford, Pergamon Press.

Irrigary, J. (1987). A study of atomic elements diffusion in coral after implantation in vivo. Bordeaux, France, Biomat.

Kaigler, D., Avila-Ortiz, G., Travan, S., Taut, A.D., Padial-Molina, M., Rudek, I., Wang, F., Lanis, A. & Giannobile, W.V. (2015) Bone engineering of maxillary sinus bone deficiencies using enriched CD90+ stem cell therapy: a randomized clinical trial. *J Bone Miner Res* 30(7): 1206-1216.

Kalkwarf, K.L. & Reinhardt, R.A. (1988) The furcation problem. Current controversies and future directions. *Dent Clin North Am* 32: 243-266.

Kao, R.T., Nares, S. & Reynolds, M.A. (2015) Periodontal regeneration- intrabony defects: a systematic review from the AAP regeneration workshop. *Journal of Periodontology* 86: S77-S104.

Khoshkam, V., Chan, H.L., Lin, G.H., Mailoa, J., Giannobile, W.V., Wang, H.L. & Oh, T.J. (2015) Outcomes of regenerative treatment with rhPDGF-BB and rhFGF-

- 2 for periodontal intra-bony defects: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* 42(3): 272-280.
- Kinoshita, Y. & Maeda, H. (2013) Recent developments of functional scaffolds for craniomaxillofacial bone tissue engineering applications. *Scientific World Journal*. Epub, doi: 10.1155/2013/863157.
- Kitagawa, H., Scheetz, J.P. & Farman, A.G. (2003) Comparison of complementary metal oxide semiconductor and charge-coupled device intra-oral x-ray detectors using subjective image quality. *Dentomaxillofacial Radiology* 32: 408-11.
- Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofuji, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M., Kido, J., Nagata, T., Kurihara, H., Takashiba, S., Sibutani, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Yamazaki, K., Yoshie, H., Ioroi, K., Arai, T., Nakagawa, T., Ito, K., Oda, S., Izumi, Y., Ogata, Y., Yamada, S., Shimauchi, H., Kunimatsu, K., Kawanami, M., Fujii, T., Furuichi, Y., Furuuchi, T., Sasano, T., Imai, E., Omae, M., Yamada, S., Watanuki, M. & Murakami S. (2011) FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *Journal of Dental Research* 90(1): 35-40.
- Kodama, T., Minabe, M., Hori, T. & Watanabe, Y. (1989) The effect of various concentrations of collagen barrier on periodontal wound healing. *Journal of Periodontology* 60(4): 205-210.
- Kubler, N., Reuther, J., Kirchner, T., Priessnitz, B. & Sebald, W. (1993) Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogeneic human bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 51(12): 1346-1357.
- Lang, N.P., Hammerle, C., Oesch, B. & Schenk R.K. (2000) Risk of transmission of agents associated with Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Plast Reconstr Surg* 105(6): 2273-2275.
- Larsson, L., Decker, A.M., Nibali, L., Pilipchuk, S.P., Berglundh, T. & Giannobile, W.V. (2016) Regenerative Medicine for Periodontal and Peri-implant Diseases. . *Journal of Dental Research* 95(3): 255-266.

- Lin, Z., Rios, H.F. & Cochran, D.L. (2015) Emerging regenerative approaches for periodontal reconstruction: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *Journal of Periodontology* 86(2): S134-S152.
- Listgarten, M.A. (1980) Periodontal probing: what does it mean? *Journal of Clinical Periodontology* 7: 165-176.
- Lobule, M., Jacobs, R., Maes, F., et al. (2006) Radiation dose vs. image quality for low-dose CT protocols of the head for maxillofacial surgery and oral implant planning. *Radiat Prot Dosimetry* 117(1-3): 211-216.
- Loos, B., Nylund, K., Claffey, N. & Egelberg, J. (1989) Clinical effects of root debridement in molar and non-molar teeth. A 2-year follow-up. *Journal of Clinical Periodontology* 16: 498-504.
- Ludlow, J.B., Davies-Ludlow, L.E. & Brooks, S.L. (2003) Dosimetry of two extraoral direct digital imaging devices: New-Tom cone beam CT and Orthophos Plus DS panoramic unit. *Dentomaxillofacial Radiology* 32: 229-234.
- Lundgren, D., Nyman, S., Mathisen, T., Isaksson, S. & Klinge, B. (1992) Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 20(6): 257-260.
- Mah, J.K., Danforth, R.A., Bumann, A. & Hatcher, D. (2003) Radiation absorbed in maxillofacial imaging with a new dental computed tomography device. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 96(4): 508-13.
- Martin, R.B., Chapman, M.W., Holmes, R.E., Sartoris, D.J., Shors, E.C., Gordon, J.E., Heitter, D.O., Sharkey N.A. & Zissimos, A.G. (1989) Effects of bone ingrowth on the strength and non-invasive assessment of a coralline hydroxyapatite material. *Biomaterials* 10(7): 481-488.
- Marx, R.E. & Carlson E.R. (1991) Creutzfeldt-Jakob disease from allogeneic dura: a review of risks and safety. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 49(3): 272-274; discussion 274-275.

- Matsumoto, M.A., Filho, H.N., Francischone, E. & Consolaro, A. (2002) Microscopic analysis of reconstructed maxillary alveolar ridges using autogenous bone grafts from the chin and iliac crest. *International journal of oral and maxillofacial implants* 17(4): 507-516.
- McGuire, M.K., Kao, R.T., Nevins M. & Lynch S.E. (2006) rhPDGF-BB promotes healing of periodontal defects: 24-month clinical and radiographic observations. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 26(3): 223-231.
- McKay, W.F., Peckham, S.M. & Badura, J.M. (2007) A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *International orthopaedics* 31(6): 729-734.
- Mengel, R., Candir, M., Shiratori, K., et al. (2005) Digital volume tomography in the diagnosis of periodontal defects: an in vitro study on native pig and human mandibles. *Journal of Periodontology* 76, 665-73.
- Miron, R.J., Sculean, A., Cochran, D.L., Froum, S., Zucchelli, G., Nemcovsky, C., Donos, N., Lyngstadaas, S.P., Deschner, J., Dard, M., Stavropoulos, A., Zhang, Y., Trombelli, L., Kasaj, A., Shirakata, Y., Cortellini, P., Tonetti, M., Rasperini, G., Jepsen, S. & Bosshardt, D.D. (2016) Twenty years of enamel matrix derivative: the past, the present and the future. *Journal of Clinical Periodontology* 43(8): 668-683.
- Misch, K.A., Yi, E.S. & Sarment, D.P. (2006) Accuracy of cone beam computed tomography for periodontal defect measurements. *Journal of Periodontology* 77, 1261-66.
- Miyamoto, S. & Takaoka, K. (1993) Bone induction and bone repair by composites of bone morphogenetic protein and biodegradable synthetic polymers. *Annales chirurgiae et gynaecologiae Suppl* 207: 69-75.
- Mol, A. & Balasundaram, A. (2008) In vitro cone beam computed tomography imaging of periodontal bone. *Dentomaxillofacial Radiology* 37, 319-24.
- Mordenfeld, A., Hallman, M., Johansson, C.B. & Albrektsson, T. (2010) Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary

- sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clinical Oral Implants Research* 21(9):961-970.
- Mozzo, P., Procacci, C., Tacconi, A., Martini, P.T. & Andreis, I.A. (1998) A new volumetric CT machine for dental imaging based on the cone-beam technique: Preliminary results. *European Radiology* 8, 1558-1564.
- Murphy, K.G. & Gunsolley, J.C. (2003) Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Annals of periodontology* 8(1): 266-302.
- Nevins, M. L., Camelo, M., Schupbach, P., Kim, D.M., Camelo, J. & Nevins, M. (2009) Human histologic evaluation of mineralized collagen bone substitute and recombinant platelet-derived growth factor-BB to create bone for implant placement in extraction socket defects at 4 and 6 months: a case series. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 29(2): 129-139.
- Nevins, M., Kao, R.T., McGuire, M.K., McClain, P.K., Hinrichs, J.E., McAllister, B.S., Reddy, M.S., Nevins, M.L., Genco, R.J., Lynch, S.E. & Giannobile, W.V. (2013) Platelet-derived growth factor promotes periodontal regeneration in localized osseous defects: 36-month extension results from a randomized, controlled, double-masked clinical trial. *Journal of Periodontology* 84(4): 456-464.
- Nordland, P., Garrett, S., Kiger, R., Vanooteghem, R., Hutchens, L.H. & Egelberg, J. (1987) The effect of plaque control and root debridement in molar teeth. *Journal of Clinical Periodontology* 14, 231-236.
- Pagni, G., Kaigler, D., Rasperini, G., Avila-Ortiz, G., Bartel, R., Giannobile, W.V. (2012) Bone repair cells for craniofacial regeneration. *Advanced drug delivery reviews* 64(12): 1310-1309.
- Papapanou, P.N. & Tonetti, M.S. (2000) Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions. *Periodontology* 2000 22, 8-21.
- Park, C.H., Rios H.F., Jin, Q., Sugai, J.V., Padial-Molina, M., Taut, A.D., Flanagan, C.L., Hollister, S.J. & Giannobile, W.V. (2012) Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. *Biomaterials* 33(1): 137-145.

- Park, C.H., Rios, H.F., Taut, A.D., Padial-Molina, M., Flanagan, C.L., Pilipchuk S.P., Hollister S.J. & Giannobile, W.V. (2014) Image-based, fiber guiding scaffolds: a platform for regenerating tissue interfaces. *Tissue Engineering Part C Methods* 20(7): 533-542.
- Piattelli, A. (2003). Biomateriali utilizzati in rigenerazione ossea: risultati istologici. *Implantologia Orale* 4: 77-80.
- Pilipchuk, S.P., Plonka, A.B., Monje, A., Taut, A.D., Lanis, A., Kang, B. & Giannobile, W.V. (2015) Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dental Materials* 31(4): 317-338.
- Ramadan, A.B. & Mitchell, D.F. (1962) A roentgenographic study of experimental bone destruction. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 15: 934-943.
- Rasperini, G., Pilipchuk S.P., Flanagan, C.L., Park, C.H., Pagni, G., Hollister S.J. & Giannobile, W.V. (2015) 3D-printed Bioresorbable Scaffold for Periodontal Repair. *Journal of Dental Research* 94(9 Suppl): 153S-157S.
- Rasperini, G., Silvestri, M. & Ricci, G. (2005). Long-term clinical observation of treatment of infrabony defects with enamel matrix derivative (Emdogain): surgical reentry. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 25(2): 121-127.
- Rasperini, G., Silvestri, M., Schenk, R.K. & Nevins, M.L. (2000) Clinical and histologic evaluation of human gingival recession treated with a subepithelial connective tissue graft and enamel matrix derivative (Emdogain): a case report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 20(3): 269-275.
- Rees, T., Biggs, N.L. & Collins, C.K. (1971) Radiographic interpretation of periodontal osseous defects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 2: 141-153.
- Ripamonti, U., Heliotis, M., Rueger, D.C. & Sampath, T.K. (1996) Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Archives of Oral Biology* 41(1): 121-126.

- Sasaoka, K., Seto, K., Tsugita, M. & Tsuru, S. (1989) An immunological study of tricalcium phosphate supplied by three different manufacturers. *Journal of clinical and laboratory immunology* 30(4): 197-202.
- Scaf, G., Lurie, A.G., Mosier, K.M., Kantor, M.L., Ramsby, G.R. & Freedman, M.L. (1997) Dosimetry and cost of imaging osseointegrated implants with film-based and computed tomography. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 83: 41-48.
- Schulze, D., Heiland, M., Thurmann, H. & Adam, G. (2004) Radiation exposure during midfacial imaging using 4- and 16-slice computed tomography, cone beam computed tomography systems and conventional radiography. *Dentomaxillofacial Radiology* 33(2): 83-86.
- Sculean, A, Nikolidakis, D., Nikou, G., Ivanovic, A., Chapple, I.L. & Stavropoulos, A. (2015) Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontology* 2000 68(1): 182-216.
- Seunarine, K., Gadegaard, N., Tormen, M., Meredith, D.O., Riehle, M.O. & Wilkinson, C.D. (2006) 3D polymer scaffolds for tissue engineering. *Nanomedicine (Lond)* 1(3): 281-296.
- Società Italiana di Parodontologia. Consensus sulla Diagnosi in Parodontologia. Incontro dei Soci Attivi Merano, 18-19 settembre 1998 (Livello IV).
- Takayama, S., Murakami, S., Shimabukuro, Y., Kitamura, M. & Okada, H. (2001) Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *Journal of Dental Research* 80(12): 2075-2079.
- Urist, M.R. & Dowell, T.A. (1968). Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 61: 61-78.
- Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* (150): 893-899.
- Urist, M.R., Dowell, T.A., Hay P.H. & Strates, B.S. (1968) Inductive substrates for bone formation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 59: 59-96.

- Urist, M.R., Mikulski, A.J., Nakagawa, M. & Yen, K. (1977) A bone matrix calcification-initiator non collagenous protein. *American Journal of Physiology* 232(3): C115-127.
- Vandenberghe, B., Jacobs, R. & Yang, J. (2007) Diagnostic validity (or acuity) of 2D CCD versus 3D CBCT-images for assessing periodontal breakdown. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 104: 395-401.
- Walter, C., Weiger, R. & Zitzmann, N.U. (2010) Accuracy of three-dimensional imaging in assessing maxillary molar furcation involvement. *Journal of Clinical Periodontology* 37, 436-441.
- Walter, C., Weiger, R. & Zitzmann, N.U. (2011) Periodontal surgery in furcation-involved maxillary molars revisited: an introduction of guidelines for comprehensive treatment. *Clinical Oral Investigation* 15, 9-20.
- Walter, C., Weiger, R., Dietrich, T., Lang, N.P. & Zitzmann, N.U. (2012) Does three-dimensional- al imaging offer a financial benefit for treating maxillary molars with furcation involvement? A pilot clinical case series. *Clinical Oral Implants Research* 23, 351-358.
- Wang, H.L., Greenwell, H., Fiorellini, J., Giannobile, W., Offenbacher, S., Salkin, L., Townsend, C., Sheridan, P. & Genco, R.J. (2005) Periodontal regeneration. *Journal of Periodontology* 76(9): 1601-1622.
- Wei, G., Jin, Q., Giannobile, W.V. & Ma P.X. (2007) The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials* 28(12): 2087-2096.
- Wetzel, A.C., Stich, H. & Caffesse, R.G. (1995) Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clinical Oral Implants Research* 6(3): 155-163.
- Whittaker, J.M., James, R.A., Lozada, J., Cordova, C. & GaRey, D.J. (1989) Histological response and clinical evaluation of heterograft and allograft materials in the elevation of the maxillary sinus for the preparation of endosteal dental

implant sites. Simultaneous sinus elevation and root form implantation: an eight-month autopsy report. *Journal of Oral Implantology* 15(2): 141-144.

Wikesjo, U. M., Sorensen, R.G., Kinoshita, A., Jian, Li X. & Wozney, J.M. (2004) Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human bone morphogenetic protein-12 (rhBMP-12) on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *Journal of Clinical Periodontology* 31(8): 662-670.

Winet, H. & Hollinger, J.O. (1993) Incorporation of polylactide-polyglycolide in a cortical defect: neoosteogenesis in a bone chamber. *Journal of Biomedical Materials Research* 27(5): 667-676.

Zinner, I.D. & Small, S.A. (1996) Sinus-lift graft: using the maxillary sinuses to support implants. *Journal of the American Dental Association* 127(1): 51-57.