

Impiego Del Solfato Di Calcio In Odontoiatria Rigenerativa

Donato Di Iorio, Angelo Cicchetti, Sergio Frisone, Giovanna Murmura

Università Degli Studi “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara

Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche

Direttore Prof. Sergio Caputi;

Corrispondenza:

Donato Di Iorio

Università Degli Studi “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara

Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche

Via Dei Vestini n° 31

Nuovo Polo Didattico palazzina A

66013 Chieti Scalo - CH

d.iiorio@unich.it

Riassunto

L'odontoiatria rigenerativa si basa su quattro fattori chiave, rappresentati (I) cellule progenitrici; (II) fattori umorali; (III) scaffold; (IV) rete vascolare. Un tessuto rigenerato rappresenta il risultato di un numero notevole di interazioni molecolari che occorrono a livello sia intra-, sia extra-cellulare; esiste, inoltre, una serie di condizioni che devono essere rispettate affinché i processi molecolari possano fornire un risultato concreto sul piano clinico. Tali condizioni sono rappresentate da (I) prevenzione della colonizzazione batterica; (II) stabilità meccanica del sito; (III) presenza del coagulo; (IV) isolamento del sito; (V) utilizzo di biomateriali capaci di favorire i fenomeni rigenerativi.

Nel presente lavoro vengono riportati, in forma di revisione, i risultati di una serie di lavori che riguardano il solfato di calcio. Il suo utilizzo in campo medico è, infatti, molto comune e risale a diversi anni fa. La letteratura riporta che esso è compatibile con l'impiego nei trattamenti rigenerativi in quanto non produce reazioni avverse. Il suo maggior limite è rappresentato, però, dal troppo veloce riassorbimento rispetto alla velocità con cui procede la neo-osteogenesi e questo ne limita, in talune circostanze, l'impiego clinico.

Parole Chiave

Ingegneria Tissutale; Rigenerazione Ossea; Solfato Di Calcio.

Abstract

Regenerative dentistry is basically based on four key components: (I) scaffolds; (II) stem cells; (III) signalling molecules, (IV) vascular supply. Any engineered tissue represent the result of numerous molecular interactions inside and outside the cells, so in order to obtain a clinically relevant regenerative process, the following factors should be addressed: (I) prevention of acute inflammation from bacteria; (II) mechanical stability of the wound; (III) creation and maintenance

of blood clot filled spaces; (IV) isolation of the regenerative space from undesirable competing tissues; (V) creation of a desirable surface chemistry, that directly influence cellular response.

In the present manuscript, the results of a series of in vitro and in vivo studies concerning medical grade calcium sulfate particles and cements, were reported.

Among synthetic bone graft materials, calcium sulfate is the very common since it is in use for many decades. Literature reports that it produces no adverse effects or inflammatory reaction at the recipient site. It is also biocompatible, and provides a satisfactory barrier against the invasion of surrounding soft tissue in the defect area. Major shortcoming related to the use of calcium sulphate is its half-life, that is shortest than the time required for new bone formation and that restrict the employment of calcium sulphate to small bone defects.

Key Words

Tissue Engineering; Bone Regeneration; Calcium Sulphate.

L'odontoiatria rigenerativa muove le basi dalla ingegneria tissutale e rappresenta, oggi, una branca relativamente nuova dell'odontoiatria. Essa si basa sul potenziale biologico offerto dall'organismo vivente al fine di raggiungere il fine terapeutico, rappresentato dalla rigenerazione dei tessuti persi (1). Srisuwan T. e coll. riconoscono almeno quattro fattori chiave nel processo di rigenerazione: (I) cellule progenitrici, capaci di dare origine alle cellule che produrranno il tessuto che si vuole rigenerare; (II) fattori umorali, ovvero gli ormoni ed i fattori di crescita, a cui spetta il compito di guidare le cellule progenitrici verso la differenziazione; (III) scaffold, ovvero l'impalcatura, la struttura che ospita le cellule ed i fattori umorali durante il processo rigenerativo. Il coagulo, per esempio, rappresenta lo scaffold naturale di cui si è dotato l'organismo per favorire i processi di riparazione/rigenerazione. Nella pratica terapeutica, però, accade che si utilizzino dei materiali diversi allo scopo di integrare la funzione del coagulo, ed in questi casi si parla di biomateriali. (IV) rete vascolare, che consente alle cellule ed ai fattori umorali di raggiungere il sito chirurgico (fig. 1).

La formazione ed il mantenimento nel tempo di un tessuto rigenerato dipendono da numerosi processi biochimici, alcuni dei quali ancora ignoti: così, secondo Schwartz Z e coll. (2) esistono almeno cinque condizioni che devono essere rispettate al fine di ottenere un risultato clinicamente apprezzabile: (I) prevenzione della colonizzazione batterica; (II) stabilità meccanica del sito; (III) presenza del coagulo; (IV) isolamento del sito al fine di prevenire l'invasione da parte di tessuti con turn-over più veloce; (V) utilizzo di biomateriali capaci di favorire i fenomeni rigenerativi.

I fattori enunciati sia da Srisuwan T, sia da Schwartz rientrano, in buona parte, nei meccanismi che vengono adottati dagli organismi viventi durante le fasi di riparazione di una ferita.

La pratica clinica dispone, però, di strumenti che tendono a dirigere la funzione dei meccanismi rigenerativi naturali verso il fine terapeutico; in questo senso, gli strumenti di utilizzo più comune nella rigenerazione dei tessuti orali sono rappresentati dai biomateriali. Essi intervengono a sostituire parzialmente le funzioni offerte dal coagulo nei siti in cui occorre rigenerare il tessuto

osseo: i biomateriali, infatti, vengono utilizzati perchè presentano, rispetto al coagulo di fibrina, un tempo di riassorbimento più lento, compatibile con i tempi necessari alla osteogenesi.

Ad oggi sono disponibili diversi materiali da rigenerazione ossea (fig. 2); sul piano funzionale essi rispondono a quattro requisiti fondamentali:

- osteointegrazione. Il materiale entra in contatto con la superficie dell'osso nativo senza l'interposizione di alcun tessuto.
- osteoinduzione. Il biomateriale induce la differenziazione delle cellule pluripotenti presenti nel sito ricevente verso il fenotipo fibroblastico.
- osteoconduzione. La superficie del biomateriale si lascia colonizzare dagli elementi cellulari deputati alla osteogenesi.
- osteogenesi. Il biomateriale partecipa attivamente al processo di neo-osteogenesi mediante le cellule osteoprogenitrici presenti al suo interno.

Secondo J. W. Frame (3), un biomateriale da rigenerazione ossea dovrebbe:

- essere accettato dal sito ricevente senza alcuna reazione avversa; esso, pertanto, deve essere privo di potere tossico, allergenico o carcinogenico.
- Favorire l'osteogenesi.
- Favorire il processo di guarigione riducendo la possibilità di infezioni post-operatorie.
- Conservare le caratteristiche morfologiche dell'innesto.
- Fornire la stabilità meccanica sufficiente per resistere ai carichi funzionali applicati durante il periodo di guarigione.

Sulla base di quanto propone W.R. Moore (4) i materiali da rigenerazione ossea si classificano secondo lo schema seguente:

- Auto-trapianto (osso autogeno)
- Allo-trapianto (osso da cadavere)
- Innesti di materiali sintetici

E. Gageda (5), suggerisce, infine, una classificazione del tutto simile, a cui aggiunge la serie degli Xeno-trapianti, ovvero innesti di osso provenienti da un donatore che appartiene ad una specie diversa dal ricevente.

L'osso autogeno è osteoinduttivo, osteoconduttivo ed osteogenico, tanto da essere riconosciuto come il materiale più efficace. Il prelievo può essere effettuato da una sede intraorale, ad esempio il ramo mandibolare o il mento (fig. 3), ovvero extraorale, ad esempio la cresta iliaca (fig. 4) e si utilizza generalmente sia osso midollare, sia corticale. L'efficacia dell'autotrapianto deriva dal suo alto potenziale osteogenico, dovuto al fatto che esso conserva, durante le fasi di prelievo e di innesto, i precursori delle cellule osteoprogenitrici (6) (fig. 5).

Secondo C.G. Finkemeier (7), la formazione di nuovo tessuto osseo avviene, nei casi di autotrapianto, in due fasi: durante una prima fase, che dura circa quattro settimane, le cellule presenti nel materiale innestato darebbero il maggior contributo alla neoformazione di osso; seguirebbe, poi, una seconda fase in cui il rimaneggiamento avverrebbe ad opera delle cellule osteoprogenitrici presenti nel sito ricevente. Secondo alcuni autori esiste, inoltre, una differenza tra osso autologo midollare e corticale in termini di comportamento biologico durante le fasi di guarigione: l'innesto di midollare verrebbe vascolarizzato in tempi più rapidi, ma non sempre garantisce una sufficiente resistenza meccanica; il suo utilizzo sarebbe pertanto raccomandato nel riempimento di difetti di piccole dimensioni che non vengono sollecitati durante la guarigione.

Gli innesti di osso autologo corticale, invece, andrebbero in contro ad un rimaneggiamento più lento; d'altra parte essi forniscono una resistenza meccanica migliore tale da raccomandarne l'utilizzo nei casi in cui il sito ricevente si trova ad essere sottoposto a sollecitazioni funzionali.

In generale, quindi, i vantaggi legati all'utilizzo degli autotrapianti sono riferibili essenzialmente alla alta percentuale di successo, al basso rischio di trasmettere malattie infettive ed alla istocompatibilità.

Gli svantaggi, invece, derivano essenzialmente dalle procedure di prelievo che possono determinare, nei casi più severi, delle complicanze maggiori rispetto a quelle del sito ricevente.

L'osso prelevato da cadavere viene trattato secondo protocolli specifici e conservato nelle banche dell'osso per gli utilizzi futuri. Questo tipo di innesto presenta le stesse caratteristiche dell'osso autologo, ad eccezione del potenziale osteogenico, in quanto esso non contiene cellule vive (fig. 6).

L'impiego di un allo-innesto evita al paziente di subire l'intervento altrimenti necessario per il prelievo e riduce, pertanto, la possibilità di complicanze post-operatorie.

Materiali sintetici da innesto. Diversi materiali appartengono a questa famiglia. Secondo W. R. Moore (4), essi possono essere classificati secondo il seguente schema:

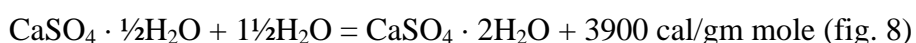
- Vetri bioattivi
- Ceramiche bioattive
- Vetro ionomeri
- Ossido di alluminio
- Solfato di calcio
- Fosfato di calcio
- Fosfato tricalcico *Beta*
- Idrossiapatite sintetica
- Idrossiapatite corallina
- Cementi a base di fosfato di calcio

Sulla base di quanto suggerisce J. W. Frame (3), i materiali metallici (tantalio e titanio) ed i polimeri (polimetilmetacrilato, polivinil-alcool e siliconi) completano l'elenco precedente.

In generale i materiali sintetici sono solo osteoconduttivi (4), ma rispetto al trapianto autologo non necessitano delle procedure di prelievo.

Alcuni dei materiali elencati sono non-riassorbibili, quali ad esempio i metalli, l'ossido di alluminio, alcuni polimeri, il vetro monomeri e l'idrossiapatite sintetica sinterizzata. Gli altri si riassorbono in vari gradi secondo la loro natura chimica.

Tra tutti i materiali riassorbibili citati sopra, il solfato di calcio è il più comune in quanto è usato da molti decenni. È stato documentato il suo uso per il trattamento delle fratture sin dal decimo secolo da parte degli arabi, mentre già nel 1892 Dreesman usava il solfato di calcio medicato con una soluzione al 5 % di fenolo per trattare l'osteomielite tubercolotica delle ossa lunghe. Altri autori hanno riportato l'utilizzo del solfato di calcio nel trattamento delle lesioni parodontali, nel rialzo del seno mascellare e nelle lesioni endodontiche (fig. 7). Fra tutti i materiali sintetici, il solfato di calcio è quello che ha la storia clinica più lunga. Questo è un materiale presente in natura come solfato di calcio diidrato ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); è prelevato dalle miniere e viene lavorato con un processo di calcinazione, ovvero la procedura che permette di ottenere un prodotto parzialmente o totalmente disidratato. La forma usata in campo dentale è quella semidrata ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$); questo è disponibile in commercio come polvere che va incontro a reazione di presa quando viene miscelata con acqua. In base al metodo di calcinazione, possono essere ottenute due differenti forme di solfato di calcio semi-idrato; se la calcinazione è eseguita per mezzo di un contenitore aperto alla temperatura di $110^\circ\text{C} - 120^\circ\text{C}$ si ottiene la forma beta-semidrata; quando, invece, lo stesso processo avviene in autoclave a 130°C , si ottiene la forma alfa-semidrata. La prima forma si presenta con particelle di forma irregolare e porose, mentre la seconda ha particelle dense, regolari e aghiformi. Dopo la reazione di presa, la forma alfa e la beta danno luogo a due prodotti differenti in termini di resistenza alla compressione e porosità interna. La reazione di presa è esotermica e può essere rappresentata come segue:



Il tempo di presa può essere modificato controllando vari fattori, come il tempo di miscelazione, rapporto polvere/liquido, temperatura, additivi e materiali colloidali. Il solfato di calcio è usato in odontoiatria da circa 30 anni (8). Molti studi in vivo mostrano l'assenza di reazioni infiammatorie o

eventi avversi nel sito. Questo è inoltre biocompatibile, e forma una soddisfacente barriera contro l'invasione dei tessuti molli circostanti l'area del difetto.

Nel 2000, A. G. Hadjipavlou e coll. (9) hanno condotto uno studio in vivo finalizzato a stabilire l'affidabilità del solfato di calcio come materiale da riempimento dei difetti ossei. L'indagine prevedeva l'impiego di 30 pecore adulte divise in due gruppi di 15 soggetti ciascuno. In ciascun animale veniva creato un difetto osseo sperimentale nel corpo vertebrale di L4; i difetti venivano trattati con osso autologo prelevato dalla cresta iliaca in un gruppo, e con solfato di calcio nell'altro gruppo. Dal lavoro di A. G. Hadjipavlou (9) si evince che sia l'autotrapianto, sia l'innesto condotto mediante solfato di calcio esitano, a 6 mesi, nella formazione di un volume osseo equipollente nei due gruppi. Inoltre, anche le caratteristiche meccaniche dell'osso rigenerato nei due gruppi sono simili in termini di resistenza alla flessione ed alla torsione. L'indagine istomorfometrica rileva, infine, che la microstruttura del tessuto rigenerato è normale.

In uno studio condotto nel 2004, G. Orsini e coll. (10) hanno condotto una valutazione istologica sulla struttura dell'osso rigenerato mediante solfato di calcio nel modello animale. Questo studio è interessante perché ha previsto l'impiego del solfato nelle due forme, granulare ed in polvere. L'innesto veniva eseguito in un difetto osseo sperimentale di 8 mm di diametro creato nella tibia di coniglio; ogni animale riceveva il solfato di calcio granulare in una tibia e quello in polvere nella tibia controlaterale. L'esame istologico veniva, infine, condotto a due ed a quattro settimane dal momento dell'innesto.

A due settimane di distanza si evidenziava la presenza di una differenza tra i due gruppi: nei siti riempiti con la forma in polvere, la neoformazione ossea avveniva solo alla periferia dell'innesto; nei difetti trattati con la forma granulare, invece, il tessuto neoformato era presente anche al centro del difetto, tra i granuli in via di riassorbimento. L'indagine istomorfometrica condotta sui campioni trattati con la forma in polvere rivelava la presenza di tessuto osseo neoformato in ragione del $10.3\% \pm 1.7\%$, mentre il biomateriale residuo, non ancora riassorbito, rappresentava il $15.2\% \pm 2.1\%$ del campione. Nei siti trattati con solfato granulare, invece, il tessuto neoformato

rappresentava il $10.5\% \pm 1.8\%$ del campione, mentre i residui di solfato erano presenti nel $16.1\% \pm 2.4\%$ del sito. L'analisi inferenziale statistica rivelava, infine, l'assenza di una differenza significativa tra le percentuali calcolate nei due gruppi.

Nei campioni prelevati a quattro settimane, invece, era presente una quantità maggiore di tessuto osseo, a scapito del materiale da innesto che era quasi del tutto riassorbito. I dati istomorfometrici evidenziavano che l'osso neoformato era presente, nei campioni trattati con solfato di calcio in polvere, in ragione del $34.1\% \pm 2\%$, con un $3.3\% \pm 0.4\%$ di biomateriale residuo. Nel gruppo trattato con solfato in granuli, invece, l'osso era presente in un'area pari a $33.5\% \pm 1.7\%$, con un $3.6\% \pm 1\%$ di solfato di calcio residuo. Anche a quattro settimane non esistevano differenze statisticamente significative tra i gruppi ma qui, sul piano ultrastrutturale, il tessuto rigenerato appariva più maturo, ovvero maggiormente calcificato.

Ma il risultato più significativo fornito da G. Orsini e coll. risiede nel fatto che essi documentano la presenza di un'area ricca di fosfato di calcio al confine tra il tessuto neoformato e il materiale residuo: questo risultato è in accordo con rilievi simili, effettuati in precedenza da altri gruppi di ricerca, ed evidenzia il fatto che, durante la fase di riassorbimento, il solfato di calcio si trasforma in fosfato di calcio che rappresenterebbe l'intermedio capace di promuovere l'attività osteogenica da parte delle cellule osteoprogenitrici. È stato proposto, infatti, un modello secondo il quale il solfato di calcio dissolve nell'ambiente extracellulare e gli ioni Ca^{++} in soluzione avrebbero la capacità di precipitare come fosfato di calcio, il quale creerebbe un ambiente chimico che riproduce la fase minerale del tessuto osseo e che verrebbe, pertanto, rimaneggiato dalle cellule osteoprogenitrici.

In un lavoro pubblicato nel 2004, Guarnieri e coll. (11) forniscono delle osservazioni cliniche sull'impiego del solfato di calcio. Qui gli autori conducono lo studio facendo rigenerazione nei siti post-estrattivi mediante l'utilizzo di solfato di calcio a consistenza differenziata: nelle porzioni apicali dell'alveolo essi inseriscono il solfato di calcio in granuli mentre le porzioni più cervicali del sito venivano riempite con solfato in polvere a presa rapida. L'alveolo veniva infine chiuso senza

l'utilizzo di membrane. A tre mesi di distanza dall'innesto gli autori effettuavano il prelievo di una carota di tessuto rigenerato che veniva processata per l'esame istologico.

Qui Guarnieri e coll. trovano che il volume della cresta edentula residua veniva conservato. L'istologia inoltre evidenziava che il solfato di calcio era stato riassorbito interamente e non erano presenti ne tessuto connettivo, ne tanto meno tessuto infiammatorio. L'osso neoformato presentava una struttura trasecolare normale, senza differenze tra le porzioni apicali o cervicali dell'innesto. Quest'ultimo dato rappresenta a nostro avviso, un risultato significativo sotto il profilo clinico. In letteratura è riportato infatti, che in seguito ad una estrazione, la maggior contrazione del processo alveolare occorre in corrispondenza delle porzioni più coronali dell'alveolo; durante la guarigione di alveoli non trattati, infatti, sono presenti, in questa area, poche cellule osteoprogenitrici, il che fornisce un razionale alla maggior contrazione dell'alveolo in queste aree.

Un altro importante elemento di riflessione fornito dal gruppo di Guarnieri è rappresentato dal fatto che essi documentano, solo nelle parti più apicali dell'alveolo, la presenza di uno strato ricco di fosfato di calcio; questo dato si spiega secondo gli Autori, con il fatto che il solfato in granuli riassorbe più lentamente del solfato in polvere, e per questa ragione dopo tre mesi nelle aree apicali del difetto risulta ancora presente lo strato di fosfato di calcio, al contrario di ciò che accade nelle aree apicali dell'alveolo.

In letteratura sono riportati diversi studi che trattano il meccanismo coinvolto nella interazione tra il solfato di calcio e le cellule osteogeniche.

Nel 1995, M. Sidqui e coll. (12) hanno condotto uno studio in vitro con lo scopo di valutare l'aderenza degli osteoblasti, e la attività degli osteoclasti sul substrato di solfato di calcio. Gli autori hanno impiegato il clone ROS 17/2.8. proveniente da osteoblasti di ratto; le cellule sono state incubate su campioni di dentina e solfato di calcio per 24 ore a 37 °C con 5% di CO₂. Lo studio di M. Sidqui e coll. ha confermato il potenziale osteoconduttivo del solfato di calcio; inoltre ha suggerito che le cellule osteoclastiche possono contribuire al meccanismo di riassorbimento del solfato di calcio.

Di recente, F. Carinci e coll (13) hanno condotto uno studio con lo scopo di definire l'effetto del solfato di calcio sull'espressione genica. Essi hanno usato una sospensione di linee cellulari simili agli osteoblasti (MG63) ad una densità di 1×10^5 cells/ml; alla sospensione è stata aggiunta una soluzione di 0.001 mg/ml di solfato di calcio. Dopo un tempo di coltura di 24 ore, le cellule venivano processate per i test sul DNA. Qui gli Autori hanno trovato che diversi geni venivano regolati dopo che le cellule erano state incubate con solfato di calcio. ATM è uno di questi: esso regola molte funzioni cellulari, come la risposta ad un danno a carico del DNA, la stabilità del ciclo cellulare (proliferazione). FGFR1, invece, regola l'espressione di un gruppo di recettori dei fattori di crescita dei fibroblasti; le proteine di questa famiglia presentano una sequenza amminoacidica che si ripete; essa consiste di 3 domini extracellulari, un segmento trans-membrana idrofobico e un dominio citoplasmatico. Quando la porzione extracellulare interagisce con i fattori di crescita dei fibroblasti, si attiva una cascata di segnali che alla fine influenza la differenziazione. Il solfato di calcio inoltre regola il gene IL1RAP il quale codifica la proteina accessoria del recettore dell'interleuchina 1 che è coinvolta nella risposta cellulare nei confronti dell'interleuchina 1. F.Carinci e coll. (13) inoltre hanno trovato che il solfato di calcio regola i geni correlati con l'espressione di enzimi, quali ad esempio le proteinasi lisosomiali, ATP-asi vacuolare e la ialuronidasi lisosomiale. È interessante notare che l'ultimo enzima è probabilmente coinvolto nella proliferazione, migrazione e differenziazione cellulare. Sfortunatamente, non ci sono molti studi in letteratura riguardanti la risposta genica delle cellule osteoblastiche su solfato di calcio, quindi è difficile capire il significato clinico correlato con l'espressione dei geni sopra citati. Comunque, i risultati di F. Carinci precisano che il solfato di calcio è utile per regolare il ciclo cellulare, la trasduzione del segnale, l'immunità e gli aumenti della produzione degli enzimi lisosomiali.

Nel 1975, J. W. Frame (3) condusse uno studio in vitro con lo scopo di valutare il grado di riassorbimento e l'effetto biologico del solfato di calcio alfa semidrato. Lo studio consta di tre fasi. Nel primo, l'Autore ha impiantato 12 campioni sferici (6mm di diametro) in 12 ratti bianchi Sprague-Dawley; il sito ricevente era rappresentato dal tessuto muscolare sovrastante la colonna

vertebrale. Gli animali sono stati divisi in 4 gruppi da 3 e sono stati sacrificati alle settimane 1°, 2°, 4° e 8°. Alla valutazione istologica, si osservava la completa degradazione del solfato di calcio in forma alfa: dalla prima alla ottava settimana, infatti, il materiale innestato andava incontro ad un graduale riassorbimento. Qui, però, gli Autori documentano la presenza di una reazione infiammatoria intorno all'innesto, seppur con delle differenze tra i campioni prelevati nelle diverse settimane; alla prima settimana, infatti, erano presenti monociti e cellule giganti da corpo estraneo in contatto con le particelle di solfato di calcio, mentre il connettivo fibroso circostante era infiltrato da linfociti e da leucociti polimorfonucleati. Nei campioni prelevati nelle settimane successive, invece, l'infiltrato leucocitario scompariva ed erano presenti solo le cellule giganti polimorfonucleate in contatto con i resti di solfato di calcio, che nel frattempo andavano riassorbendosi. Nel lavoro di J. W. Frame (3), comunque, l'innesto era stato eseguito nel tessuto muscolare piuttosto che nel tessuto osseo e questo potrebbe spiegare la presenza della reazione infiammatoria.

Nella seconda fase del suo studio, J. W. Frame (3) modificava il solfato di calcio allo scopo di ottenere un materiale con una velocità di riassorbimento più lenta, ovvero più simile alla velocità con cui procede l'osteogenesi. A questo scopo, Frame rivestiva i granuli di solfato di calcio immergendoli per pochi secondi in una soluzione di *n*-butil-2-cianoacrilato. I granuli modificati venivano quindi innestati negli animali, secondo lo stesso protocollo utilizzato nella prima fase dello studio, con la differenza che ora aveva aggiunto un altro gruppo che serviva per la valutazione radiografica a sei mesi.

Le valutazioni istologiche condotte dalla prima alla ottava settimana evidenziavano l'assenza di riassorbimento del materiale innestato, così come le radiografie eseguite a sei mesi di distanza dall'innesto.

Secondo gli stessi autori, la mancata sostituzione dell'innesto da parte del tessuto osseo neoformato era dovuto al fatto che il *n*-butil-2-cianoacrilato aveva riempito le porosità presenti all'interno dei

granuli di solfato, dando origine ad un materiale composito troppo denso per essere rimaneggiato in tempi paragonabili a quelli necessari alla neo-osteogenesi.

Nella terza fase dello studio, J. W. Frame riuscì ad ottenere un materiale composito con un più alto rapporto tra solfato di calcio e *n*-butil-2-cianoacrilato: i granuli, infatti, prima di ricevere il rivestimento venivano immersi in soluzione fisiologica la quale saturava parzialmente gli interstizi e riduceva, pertanto, la quota di polimero che sarebbe stato assorbito durante la fase di rivestimento delle particelle. I granuli modificati venivano anche in questo caso innestati nei ratti da laboratorio; in realtà ciascuna cavia riceveva due innesti rappresentati uno da solfato di calcio rivestito ed uno da solfato non rivestito. Le cavie venivano radiografate settimanalmente per due mesi e qui Frame descrisse una velocità di riassorbimento del materiale rivestito che variava da 1 a 2 mm alla settimana. Lo studio di J. W. Frame pone, pertanto, la necessità di produrre un materiale composito che presenti le stesse proprietà biologiche del solfato di calcio, ma con una velocità di riassorbimento più lenta.

Conclusioni

Dalla presente revisione si evince che il solfato di calcio fornisce, a 6 mesi, dei risultati del tutto simili a quelli ottenuti con l'innesto di osso autologo, sia in termini di volume di tessuto osseo rigenerato, sia in termini di resistenza meccanica. Nella valutazione condotta in tempi più brevi (due settimane) esistono, invece, delle differenze quando si considera l'impiego del solfato di calcio in polvere rispetto alla forma in granuli. Il primo, infatti, si lascia colonizzare più lentamente, tanto che la matrice di osso neoformato è presente solo ai bordi dell'innesto; nel caso in cui si utilizzi la forma in granuli, invece, si assiste, già in tempi precoci, alla colonizzazione delle porzioni più profonde dell'innesto da parte delle cellule osteoprogenitrici. Le indagini istomorfometriche, inoltre, suggeriscono che a quattro settimane dall'intervento il materiale innestato è pressoché del tutto rimaneggiato in favore della formazione di nuovo tessuto osseo. Il meccanismo che conduce alla neoformazione ossea prevede che il solfato di calcio dissolva nell'ambiente extracellulare

dando origine ad un aumento locale della concentrazione di ioni Ca^{++} che, precipitando, formano una matrice ricca di fosfato di calcio la quale, in ultima analisi, è responsabile dell'innescamento dei meccanismi cellulari che esitano nella neo-osteogenesi.

L'impiego del solfato di calcio nei siti post-estrattivi fornisce una ulteriore indicazione in quanto conferma che l'impiego della forma in polvere rende superfluo l'utilizzo di membrane. Anche qui, inoltre, si evince l'assenza, sul piano dell'aspetto istologico, di differenze tra il tessuto osseo rigenerato e quello nativo.

Relativamente alla interazione con le cellule presenti nel sito ricevente, il solfato di calcio si comporta come materiale osteoconduttivo, cioè si lascia colonizzare dagli elementi cellulari e sembrerebbe, inoltre, che gli osteoclasti partecipino in maniera determinante al suo riassorbimento, similmente a quanto accade con il tessuto osseo nativo durante le fasi di rimodellamento.

Dal punto di vista, invece, dei fenomeni biochimici che sottintendono alle interazioni tra il solfato di calcio e le cellule, esisterebbe un effetto diretto sul DNA; tale effetto sembra esprimersi sui geni che regolano la migrazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare.

Sul piano clinico, infine, esistono delle limitazioni legate fondamentalmente al fatto che il solfato di calcio riassorbe troppo velocemente rispetto alla neo-osteogenesi e questo dato rappresenta un limite relativamente al suo utilizzo nei difetti ossei molto estesi.

Bibliografia

1. Srisuwan T, Tilkorn DJ, Wilson JL, Morrison WA, Messer HM, Thompson EW, Abberton KM. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. *Periodontol 2000*. 2006;41:88-108.
2. Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodontal Res*. 1997;32:166-71.
3. J W Frame. Porous calcium sulphate dihydrate as a biodegradable implant in bone. *J Dent*. 1975 Jul;3(4):177-87.
4. W R Moore, S E Graves, G I Bain. Synthetic bone graft substitutes. *Anz J. Surg*. 2001;71:354-361.
5. E Gageda. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implan Dent* 2004;13:301-309.
6. T J Cypher, J P Grossman. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996;35:413-417.
7. C G Finkemeier. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg* 2002;84(A):454-463.
8. G Intini, S Andreana, J E Margarone, J P Bush, R Dziak. Engineering a bioactive matrix by modifications of calcium sulfate. *Tissue Eng* 2002;8:997-1008.
9. A J Hadjipavlou, J W Simmons, J Yang, C L Nicodemus, O Esch, D J Simmons. Plaster of Paris as an osteoconductive material for interbody vertebral fusion in mature sheep. *Spine* 2000;25:10-16.
10. G Orsini, J Ricci, A Scarano, G Pecora, G Petrone, G Iezzi, A Piattelli. Bone-defect healing with calcium sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit. *J Biomed Mat Res Part B: Appl Biomater* 2004;68(B):199-208.
11. R Guarnieri, G Pecora, M Fini, N Nicoli Aldini, R Giardino, G. Orsini, A Piattelli. Medical grade valium sulfate hemihydrate in healing of human extraction sockets: clinical and histological observation at 3 months. *J Periodontol* 2004;75:902-908.

12. M Sidqui, P Collin, C Vitte, N Forest. Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclasts on calcium sulphate hemihydrate. *Biomaterials* 1995;16:1327-1332.
13. F Carinci, A Piattelli, G Stabellini, A Palmieri, L Scapoli, G Laino, S Caputi, F Pezzetti. Calcium sulfate: analysis of MG63 osteoblast-like cell response by means of a microarray technology. *J Biomed Mat Res Part B: Appl Biomat* 2004;71B:260-267

Figure

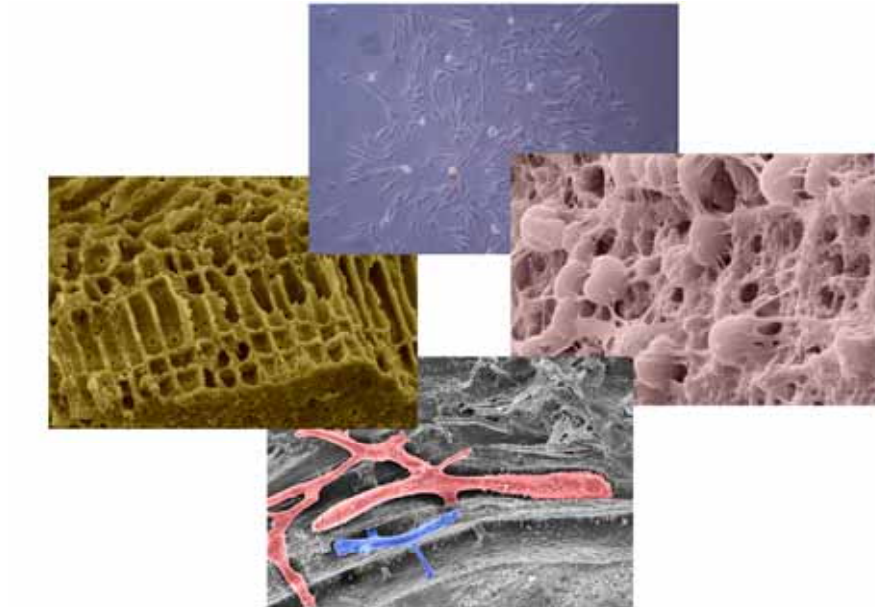


Fig. 1. L'azione concomitante dei quattro fattori chiave della terapia rigenerativa, rappresentati dalle cellule progenitrici, dai fattori umorali, dalla rete vascolare e dalla presenza di uno scaffold danno luogo al processo rigenerativo.

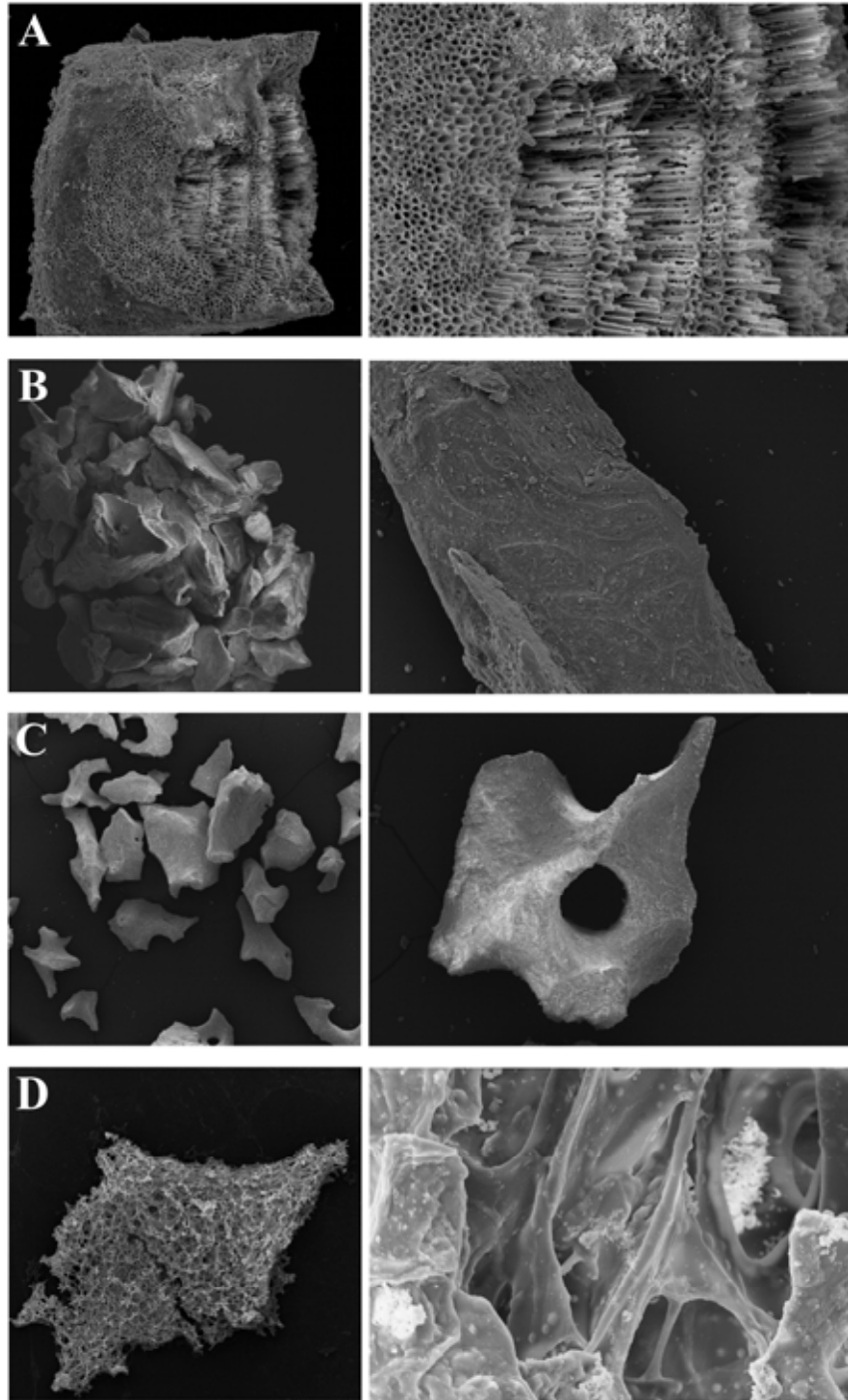


Fig. 2. alcuni materiali da rigenerazione osservati al microscopio elettronico a scansione; (A) idrossiapatite corallina; (B) osso corticale suino deproteinizzato; (C) osso spongioso bovino deproteinizzato; (D) spugna di fibrina.

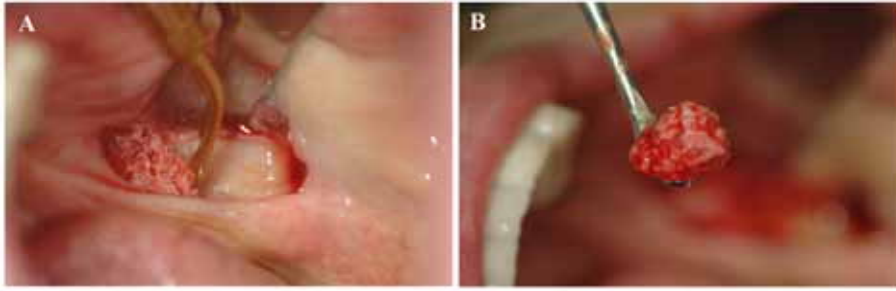


Fig. 3. (A) prelievo di osso corticale dalla porzione anteriore del ramo mandibolare; (B) il prelievo in sede intraorale fornisce spesso piccole quantità di tessuto, sufficienti a colmare difetti di dimensioni relativamente esigue.

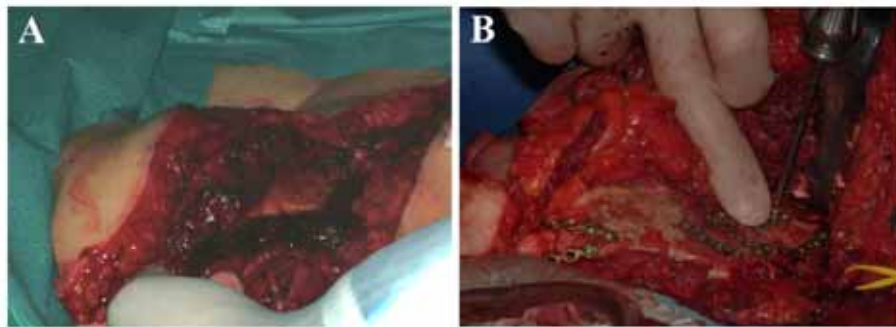


Fig. 4. (A) prelievo di osso autologo dalla cresta iliaca in un caso di ricostruzione del corpo mandibolare dopo emimandibolectomia. (B) fissaggio dell'innesto mediante viti da osteosintesi.

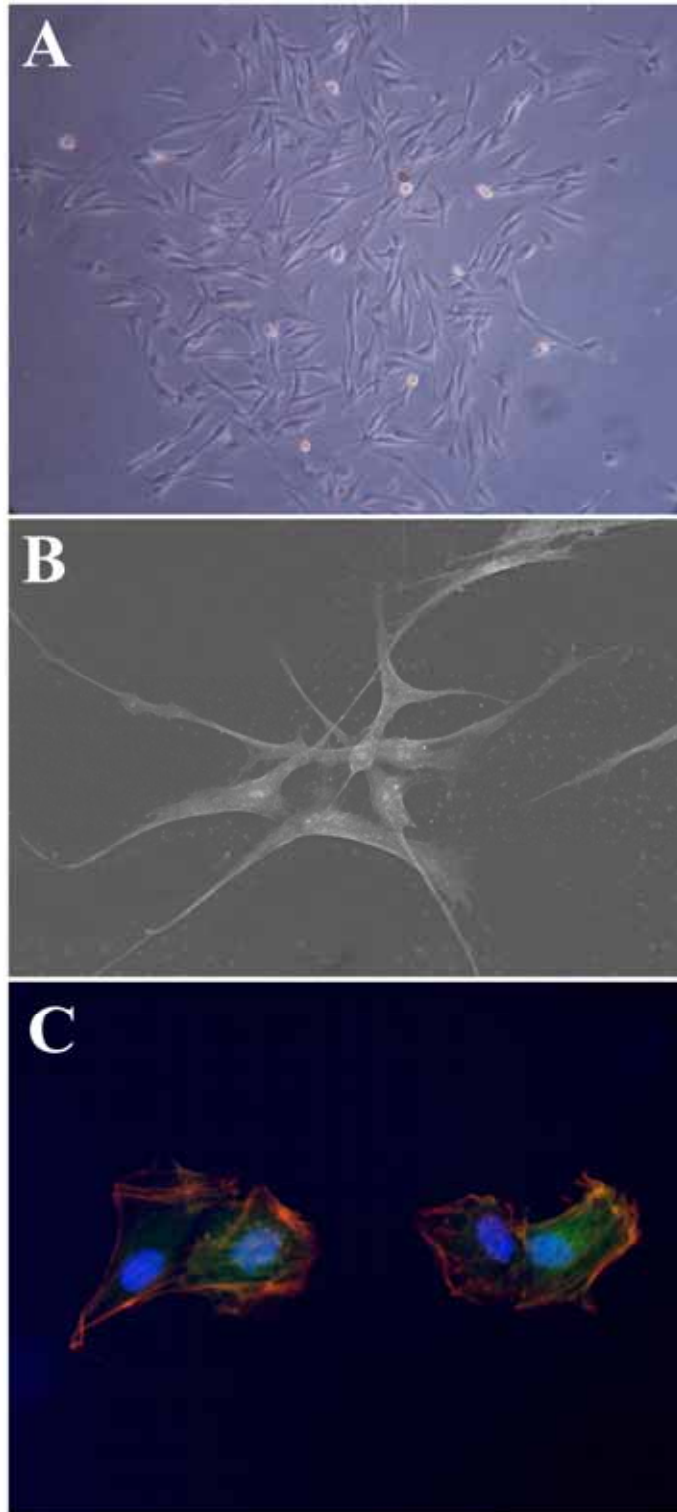


Fig. 5. Clone di cellule osteoprogenitrici coltivate in vitro osservate al microscopio ottico (A), elettronico a scansione (B) ed al confocale laser (C).



Fig. 6. qui l'osso di banca è stato utilizzato a fini sperimentali in un difetto artificiale creato nella tibia di coniglio (A). Nel riquadro B si vede l'innesto in sezione a 24 h dalla chirurgia. L'immagine in basso (C) evidenzia l'avvenuta rigenerazione a 3 mesi dall'innesto.

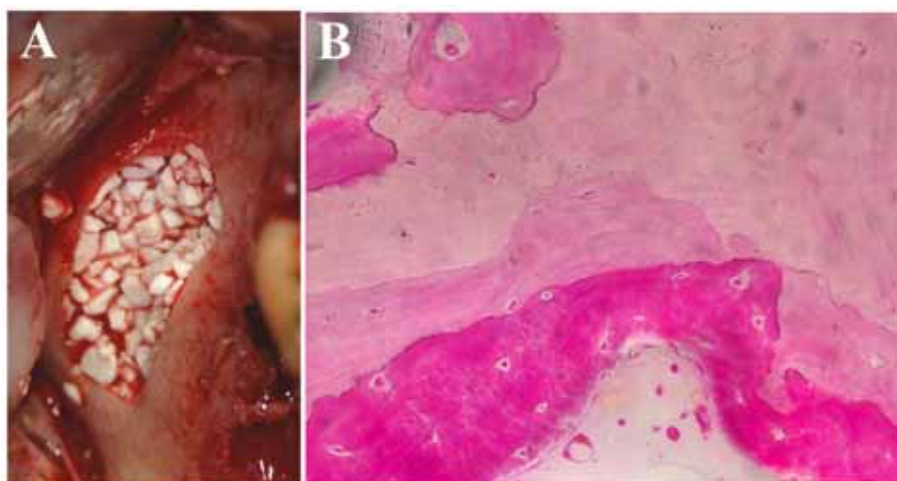


Fig. 7. (A) Solfato di calcio in granuli utilizzato nel grande rialzo del seno mascellare. (B) L'esame istologico condotto a sei mesi di distanza evidenzia la presenza di tessuto neoformato in stretto contatto con il tessuto osseo nativo.

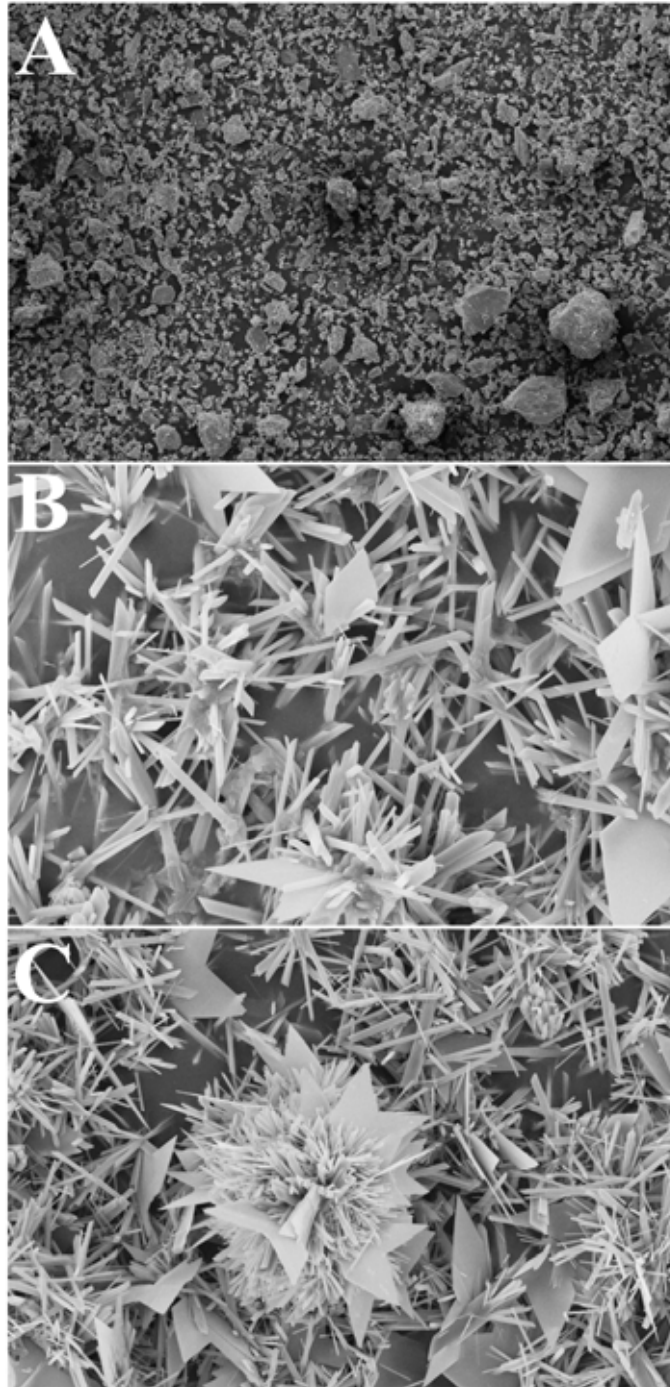


Fig. 8. (A) immagine al microscopio elettronico a scansione di particelle irregolari di solfato di calcio semi-idrato beta. (B) immagine al microscopio elettronico a scansione delle particelle aghiformi del solfato di calcio semi-idrato alfa. (C) crescita dei nuclei di cristallizzazione durante la reazione di presa.