



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato di Ricerca in Parodontologia Sperimentale

***VALUTAZIONE CLINICA E RADIOGRAFICA DEL RIMODELLAMENTO
VOLUMETRICO DEGLI INNESTI OSSEI AUTOLOGHI NELLE
RICOSTRUZIONI MAXILLO-FACCIALI DELLE CRESTE ATROFICHE A FINI
IMPLANTARI ED ANALISI A CLUSTER DEI GENI COINVOLTI NEI PROCESSI
DI RIMODELLAMENTO OSSEO***

Coordinatore

Prof. Marco Giovanni Baldoni

Tutor

Prof. Fabrizio Carini

Tesi di dottorato

Dott.ssa Natalia Filice

Matricola: 725088

Ciclo XXIV - Anno Accademico 2010/2011

*“Quando desideri qualcosa,
tutto l’universo cospira affinché
tu realizzi il tuo desiderio”*

P. Coelho

Indice

Introduzione	6
Il riassorbimento post-estrattivo delle ossa mascellari	8
Modelli di riassorbimento delle ossa mascellari	10
Classificazione della densità ossea	12
Il trattamento chirurgico dei mascellari edentuli	14
Innesti ossei	16
Osteoconduzione, osteoinduzione e osteogenesi	16
Biologia degli innesti ossei non vascolarizzati	17
Fattori condizionanti la sopravvivenza dell'innesto	19
Posizione dell'innesto	19
Microarchitettura	19
Modalità di conservazione dell'innesto	21
Modalità di prelievo	21
Orientamento dell'innesto	21
Sito ricevente	22
Metodo di fissazione al sito ricevente	22
Stress biomeccanici	22
Tasso di rivascularizzazione	22
Principali siti di prelievo dell'osso autologo	24
Prelievo da cresta iliaca	26
Tecniche di innesto	29
Innesti di apposizione orizzontale	29
Innesti di apposizione verticale	29
Grande rialzo del seno mascellare	30
Obiettivi dello studio	32
Fase Clinico-Radiografica	32
Fase Analisi Genica	32
Materiali e Metodi Fase Clinico-Radiografica	33
Trattamento chirurgico	33
Sinus Lift	34
Innesti ad <i>onlay</i> mascellari e mandibolari	34
Trattamento post-operatorio	35
Chirurgia implantare	35
Raccolta e analisi dei dati	37
Esame radiografico	37
Metodica di calcolo di volumi, aree e densità	38
Variabili misurate e derivate	44
Correlazione, fitting e interpolazione	46
Analisi statistica	47

Materiali e Metodi Fase Analisi Genica	48
Geni coinvolti nei processi di incremento e di rimodellamento osseo	48
Previsione delle possibili interazioni	49
Identificazione dei geni <i>leader</i>	49
Risultati Fase Clinico-Radiografica	52
Risultati Fase Analisi Genica	66
Discussioni Fase Clinico-Radiografica	74
Riassorbimento osso autologo nelle procedure di <i>Sinus Lift</i>	75
Riassorbimento osseo negli innesti ad <i>onlay</i> mascellari	75
Riassorbimento osseo negli innesti ad <i>onlay</i> mandibolari	76
Rimodellamento degli innesti ossei autologhi	77
Discussioni Fase Analisi Genica	78
Analisi genica del processo di incremento osseo	79
Analisi genica del processo di riassorbimento osseo	81
Conclusioni	85
Appendice	87
Appendice A	87
Appendice B	89
Appendice C	94
Appendice D	96
Appendice E	97
Appendice F	101
Bibliografia	103

Indice delle figure

<i>Figura 1.</i>	39
<i>Figura 2.</i>	41
<i>Figura 3.</i>	42
<i>Figura 4.</i>	43
<i>Figura 5.</i>	47
<i>Figura 6.</i>	56
<i>Figura 7.</i>	56
<i>Figura 8.</i>	57
<i>Figura 9.</i>	60
<i>Figura 10.</i>	60
<i>Figura 11.</i>	61

Figura 12.	64
Figura 13.	64
Figura 14.	65
Figura 15.	66
Figura 16.	67
Figura 17.	68
Figura 18.	68
Figura 19.	69
Figura 20.	69

Indice delle tabelle

<i>Tabella 1: Classificazione Cawood & Howell, 1988</i>	10
<i>Tabella 2: Classificazione della densità ossea espressa in unità Hounsfield</i>	13
<i>Tabella 3: Database e operatori di logica booleana utilizzati per l'identificazione di geni umani coinvolti nei processi di incremento e di rimodellamento osseo: i numeri risultanti dalla ricerca dei geni sono distribuiti in base ai database utilizzati.</i>	51
<i>Tabella 4. Suddivisione degli innesti a blocchetto prelevati da cresta iliaca in base al sito ricevente.</i>	52
<i>Tabella 5. Sinus Lift. Volume medio (V) misurato al tempo T_1 e al tempo T_2; superficie media di contatto (CS), volume medio dell'osso basale (BB) e superficie superiore media degli innesti (SS) misurati al tempo T_1; valore medio ricavato di R%.</i>	54
<i>Tabella 6. Sinus lift. Coefficienti ρ di Spearman tra tutte le variabili misurate e derivate (R%, CS_{T1}, SS_{T1}, BB_{T1}, $indexV_{T1}$, $indexH_{T1}$ e $indexS_{T1}$) con un livello di significatività (evidenziato in rosso) settato al 5%.</i>	55
<i>Tabella 7. Onlay mascellari. Volume medio (V) misurato al tempo T_1 e al tempo T_2; superficie media di contatto (CS), volume medio dell'osso basale (BB) e superficie superiore media degli innesti (SS) misurati al tempo T_1; valore medio ricavato di R%.</i>	58
<i>Tabella 8. Onlay mascellari. Coefficienti ρ di Spearman tra tutte le variabili misurate e derivate (R%, CS_{T1}, SS_{T1}, BB_{T1}, $indexV_{T1}$, $indexH_{T1}$ e $indexS_{T1}$) con un livello di significatività (evidenziato in rosso) settato al 5%.</i>	59

Tabella 9. Onlay mandibolari. Valori medi di V_{T1} e di V_{T2} , media delle percentuali di innesto residuo (R%), Superficie di Contatto media, l'Ossso Basale medio, la Superficie Esterna media e le comparazioni tra V_{T2} e V_{T1} e le relative Deviazioni Standard.

62

Tabella 10. Onlay mandibolari. Coefficienti ρ di Spearman tra tutte le variabili misurate e derivate (R%, CS_{T1} , SS_{T1} , BB_{T1} , $indexV_{T1}$, $indexH_{T1}$ e $indexS_{T1}$) con un livello di significatività (evidenziato in rosso) settato al 5%.

63

Tabella 11: Geni leader e geni del cluster B classificati in base al numero di citazioni in PubMed (gsc), al numero delle interazioni previste e ai punteggi specifici, nei processi di incremento e di riassorbimento osseo.

72

Tabella 12: Geni classificati in base al numero di citazioni, nei processi di incremento e di rimodellamento osseo.

73

Introduzione

Negli ultimi quindici anni, la riabilitazione dei pazienti totalmente o parzialmente edentuli, tramite l'utilizzo di impianti osteointegrati, è diventata una pratica comune, con ottimi risultati nel lungo termine.

La riabilitazione implantare necessita di un adeguato volume della cresta alveolare residua, condizione spesso disattesa, soprattutto in presenza di un edentulismo di vecchia data. La perdita degli elementi dentali è responsabile, infatti, di un processo cronico di riassorbimento delle creste residue, che può portare a gradi severi di atrofia ossea, rendendo impossibile l'immediato posizionamento degli impianti osteodentari.

In presenza di severe atrofie è possibile ripristinare una corretta volumetria ossea, finalizzata al trattamento implanto-protetico, ricorrendo a diverse tecniche di chirurgia ricostruttiva: innesti ossei vascolarizzati, innesti ossei non-vascolarizzati, rigenerazione ossea guidata, distrazione osteogenica, ingegneria tissutale¹.

Il *Progetto Genoma Umano* e la continua identificazione di geni rappresentano una straordinaria opportunità per la terapia genica e per il trattamento di numerosi disordini. Sebbene il ricorso alla terapia genica nelle tecniche di chirurgia ricostruttiva sia ancora in fase del tutto sperimentale, i continui progressi fatti nelle tecnologie di rilascio genico e nell'identificazione dei fattori coinvolti ci lasciano ipotizzare che la terapia genica possa diventare parte sempre più importante del trattamento dei disordini ossei.

Recentemente è stato proposto un approccio per l'identificazione dei geni *leader* basato su un'analisi a *cluster* dei dati genici ottenuti mediante una ricerca sistematica e ripetitiva riguardante specifici processi. Il metodo prevede l'assegnazione di specifici punteggi a ciascun gene in base al numero di interazioni rilevate e consente, pertanto, di classificare i geni coinvolti in un medesimo processo^{2,3}.

Grazie a questo tipo di ricerca e all'analisi statistica è possibile semplificare gli ingenti dati ottenuti dagli esperimenti con *microarray*.

Scopi di questo studio sono:

- valutare il riassorbimento di innesti ossei autologhi nella ricostruzione di creste atrofiche mascellari e mandibolari;
- analizzare, mediante un'analisi bioinformatica a *cluster*, i geni coinvolti nei processi di rimodellamento osseo.

Il riassorbimento dei mascellari edentuli

La perdita degli elementi dentari, oltre ad avere ripercussioni psicologiche di vario livello sul paziente, provoca il venir meno delle funzioni stomatognatica, fonetica, masticatoria ed estetica.

L'edentulia si associa spesso ad alterazioni anatomiche caratteristiche della senescenza, con modificazioni strutturali e funzionali a carico dei tessuti molli e dei tessuti duri, e variazioni nella biomeccanica dell'ATM e nelle relazioni intermascellari.

Mandibola e mascella sono costituite da due componenti ossee:

- l'osso basale, struttura scheletrica che si forma nella vita fetale ed ospita la gran parte delle inserzioni muscolari;
- l'osso alveolare, che si forma durante l'eruzione degli elementi dentari e fa parte del sistema parodontale.

L'osso è un tessuto vitale costantemente soggetto a fenomeni di neoapposizione e riassorbimento. La sua stabilità dimensionale e strutturale risulta frutto di un continuo equilibrio tra questi due processi, e, pertanto, viene definita *stabilità di tipo dinamico*.

La legge di *Wolff*⁴ afferma che l'osso si rimodella in relazione alle forze ad esso applicate: ogni volta che si modifica la funzione dell'osso, si realizzano variazioni a carico della sua architettura interna e della sua configurazione esterna.

*Roberts & Coll.*⁵ affermano che un carico del 4% sullo scheletro aiuta a mantenere in equilibrio i fenomeni di riassorbimento e neoapposizione ossei, garantendo un buono stato di trofismo dell'osso.

I denti trasmettono forze compressive e tensive all'osso alveolare: di conseguenza, alla privazione di un elemento dentario viene meno la stimolazione intraossea che conserva l'osso alveolare. Quando si perde un dente, la mancata stimolazione dell'alveolo post-estrattivo causa una diminuzione della trabecolatura e della densità ossea della zona, con rapida contrazione della dimensione vestibolo-linguale e tardiva riduzione della dimensione verticale.

L'osso basale non cambia in maniera sostanziale la propria morfologia a seguito della perdita degli elementi dentari, purchè non sottoposto a

stimoli irritativi o incongrui, poiché permangono le inserzioni muscolari a stimolarlo.

*Tallgren*⁶, mediante uno studio longitudinale a 25 anni, ha osservato che la maggior parte della perdita di osso alveolare avviene nel primo anno e continua lentamente nel tempo.

L'entità del rimaneggiamento varia da settore a settore dei mascellari e cambia a seconda dell'individuo.

La variabilità individuale è influenzata da fattori sistemici che regolano il metabolismo osseo come la calcitonina e il paratormone, da patologie sistemiche come l'osteoporosi, l'osteomalacia e dall'assunzione di farmaci (anticonvulsivanti, corticosteroidi).

Anche alcuni fattori locali sono in grado di favorire il rimodellamento osseo, tra questi ricordiamo:

- la morfologia facciale;
- le estrazioni traumatiche;
- le protesi rimovibili incongrue: possono provocare ischemia periostale e quindi favorire la perdita d'osso, nonché causare uno stimolo irritativo cronico,
- le procedure chirurgiche con lembi muco-periosteici,
- l'edentulismo di vecchia data.

Da un punto di vista clinico, il rimodellamento osseo segue dei modelli abbastanza prevedibili e simili tra loro, differenziabili a seconda delle regioni anatomiche.

Nel mascellare superiore il processo di riassorbimento è ad andamento prevalentemente orizzontale, sia nel settore anteriore che in quello posteriore.

Nella mandibola, si evidenzia un riassorbimento prevalentemente orizzontale nella regione sinfisaria e verticale nella regione posteriore.

Si realizzano, pertanto, delle alterazioni in senso sagittale dei rapporti intermascellari con tendenza alla pseudo-terza classe scheletrica.

Modelli di riassorbimento delle ossa mascellari

Cawood & Howell^{7,8} nel 1988 hanno classificato il grado di atrofia dei mascellari edentuli. Studiando le modificazioni morfologiche dei mascellari edentuli su crani secchi ed utilizzando punti definiti e facilmente riproducibili, hanno dimostrato che il riassorbimento segue schemi ripetibili e prevedibili. Hanno evidenziato che l'osso basale, in seguito alla perdita degli elementi dentari, a meno che non sia sottoposto a stimoli irritativi o incongrui, non cambia in maniera sostanziale la propria morfologia e che le creste alveolari si riassorbono secondo schemi costanti e specifici a seconda della sede interessata.

Gli Autori hanno suddiviso il grado di atrofia in sei classi mandibolari e sei classi mascellari, come indicato in *Tabella 1*.

<i>Classe I</i>	dentatura presente
<i>Classe II</i>	cresta alveolare post-estrattiva immediata
<i>Classe III</i>	cresta alveolare post-estrattiva tardiva con riossificazione dell'alveolo post-estrattivo e processo alveolare arrotondato ma adeguato in altezza e spessore
<i>Classe IV</i>	cresta con altezza adeguata ma spessore insufficiente, definita a "lama di coltello"
<i>Classe V</i>	cresta piatta, insufficiente sia in altezza che in spessore
<i>Classe VI</i>	cresta depressa, con atrofia dell'osso basale

(*Tabella 1: Classificazione Cawood & Howell, 1988*)

Nel 2004⁹ *Chiapasco* ha descritto una classificazione che tiene conto di altezza e spessore delle creste residue e della distanza interarcata, dando indicazioni sull'approccio chirurgico da seguire.

- Classe A: altezza della cresta residua fra 4 e 8 mm, spessore fino a 5mm con normale distanza interarcata. I protocolli chirurgici consigliati sono l'elevazione del seno con approccio laterale o per via trans-alveolare.
- Classe B: altezza della cresta residua fra 4 e 8 mm, spessore minore di 5 mm con normale distanza interarcata. I protocolli chirurgici consigliati sono: elevazione del seno mascellare con approccio laterale associato a

incremento trasversale mediante innesti di apposizione o rigenerazione ossea guidata.

- Classe C: altezza della cresta alveolare residua minore di 4mm, spessore maggiore o uguale a 5 mm con normale distanza interarcata. Protocollo chirurgico consigliato: elevazione del seno mascellare con approccio laterale.
- Classe D: altezza della cresta alveolare residua minore di 4mm, spessore minore di 5mm con normale distanza interarcata. Si consigliano, come protocolli chirurgici, l'elevazione del seno mascellare con approccio laterale associato ad innesti di apposizione sul versante vestibolare e rigenerazione ossea guidata.
- Classe E: stesse caratteristiche della classe A con aumento della distanza interarcata. I protocolli chirurgici consigliati sono: innesti di apposizione verticali o GBR per ripristinare la normale distanza interarcata. La GBR è la tecnica più difficile e meno prevedibile, mentre il rialzo di seno con approccio laterale può non essere indicato.
- Classe F: stesse caratteristiche della classe B con aumentata distanza interarcata. Protocollo chirurgico consigliato: elevazione del seno mascellare con approccio laterale, se indicato, si associa la ricostruzione sia verticale che trasversale della cresta residua mediante innesti di apposizione verticali e vestibolari. La GBR è da valutare con cautela.
- Classe G: stesse caratteristiche della classe C con aumentata distanza interarcata. I protocolli chirurgici consigliati sono: elevazione del seno con approccio laterale e l'utilizzo di osso autologo, a cui si associano innesti ossei autologhi di apposizione verticali.
- Classe H: stesse caratteristiche della classe D con aumento della distanza interarcata. Protocolli chirurgici consigliati: elevazione del seno con approccio laterale associata ad innesti ossei autologhi di apposizione verticali e trasversali. La GBR è poco indicata.
- Classe I: cresta alveolare completamente riassorbita con aumentata distanza interarcata e rapporti scheletrici antero-posteriori di III classe dovuti a grave ipomaxillia. Protocolli chirurgici consigliati: osteotomia del mascellare secondo le Fort 1 di avanzamento e abbassamento, con innesti ossei autologhi di interposizione, per ristabilire volume osseo, distanza interarcata e rapporto intermascellare sagittale.

Classificazione della densità ossea

Lekholm & Zarb nel 1985¹⁰ hanno introdotto una classificazione della qualità ossea dei mascellari nel paziente totalmente edentulo sulla base della valutazione radiografica preoperatoria e della percezione soggettiva della resistenza ossea al taglio durante la preparazione del sito implantare. La loro classificazione distingue:

- Osso Tipo 1: osso compatto e omogeneo quasi esclusivamente corticale.
- Osso Tipo 2: osso corticale compatto con porzione trabecolare densa.
- Osso Tipo 3: osso corticale sottile con porzione trabecolare densa.
- Osso Tipo 4: osso corticale sottile con porzione trabecolare di bassa densità.

Misch nel 1988¹¹ ha esteso questa classificazione a tutto il distretto cranio-facciale, basandosi sulle caratteristiche microscopiche delle due componenti e dividendo le tipologie di densità ossea in:

- Tipo D1: osso corticale denso e scarsa spongiosa.
- Tipo D2: osso con corticale spessa e spongiosa a maglie strette.
- Tipo D3: osso con corticale sottile e spongiosa a maglie strette.
- Tipo D4: osso con corticale sottile e spongiosa a maglie larghe.
- Tipo D5: osso immaturo e demineralizzato.

L'osso D1 non si osserva mai nel mascellare mentre è presente nella mandibola a livello della regione sinfisaria, nei casi di elevata atrofia ossea. È un osso poco indicato per il posizionamento degli impianti e per la fissazione di un innesto poiché ha una scarsa irrorazione ematica che rallenta in maniera significativa la rigenerazione dello stesso ; sono inoltre difficoltose le tecniche di preparazione del sito, in quanto la densità del tessuto impone un *torque* eccessivo cui consegue un surriscaldamento del tessuto osseo con rischio di necrosi.

La densità D2 è quella che si osserva con più frequenza nella mandibola e nel mascellare: rappresenta la qualità ossea ottimale ed è presente nel corpo mandibolare e nella zona frontale del mascellare. La corticale è sufficientemente spessa per garantire una stabilità primaria ai mezzi di fissazione e agli impianti. La buona vascolarizzazione della spongiosa garantisce adeguato sostegno ai fenomeni riparativi ossei. Si può

riscontrare in regioni parzialmente edentule in corrispondenza dei denti incisivi, canini o premolari.

L'osso di densità D3 è molto comune nel mascellare e ha caratteristiche ideali che possiamo ritrovare nella zona fronto-laterale del mascellare e nel mandibolare laterale. Le sue caratteristiche sono paragonabili a quello di classe D2 anche se, rispetto ad esso, presenta una vascolarizzazione della spongiosa inferiore.

Nella mascella, l'osso D4 si trova distalmente nel 40% dei casi e anteriormente nel 10% dei casi mentre nella mandibola si può riscontrare distalmente in creste volumetricamente ben rappresentate. È un osso poco denso che scarsamente si addice a qualsiasi terapia chirurgica. La sua corticale è molto sottile e non permette una adeguata stabilità primaria degli impianti inseriti.

Per osso D5 nella classificazione di *Misch* si intende l'osso immaturo.

Il dato clinico della densità ossea può essere rilevato con precisione per mezzo della tomografia computerizzata analizzata con programmi specifici per l'odontoiatria come il Dentascan ed il Maxiscan. I dati TC assegnano ad ogni voxel un numero che è dipendente dalla densità media dei tessuti in quello specifico volume unitario. Tale numero, che può essere messo in evidenza sulle zone radiografiche di interesse (ROI: *Region Of Interest*), fa parte di una scala standardizzata delle densità espressa in Unità *Hounsfield* (HU). Essa può assumere valori compresi tra -1500 e +2595 e associa la densità dell'acqua al valore 0 mentre quella dell'aria a valori vicini a -1500. Le strutture ossee nella scala *Hounsfield* variano tra +150 e +1500.

E' possibile rapportare i dati in unità *Hounsfield* in base alla classificazione di *Misch*, come di seguito indicato in *Tabella 2*:

HU >1250	Misch D1
850 < HU <1250	Misch D2
350 < HU < 850	Misch D3
150 < HU < 350	Misch D4
HU < 150	Misch D5

(*Tabella 2: Classificazione della densità ossea espressa in unità Hounsfield*)

Il trattamento chirurgico dei mascellari edentuli

La riabilitazione di pazienti parzialmente o totalmente edentuli tramite l'utilizzo di impianti osteodentari riveste oggi un ruolo di estrema importanza.

L'insufficiente volume osseo, la riduzione dell'altezza crestale o dello spessore e la perdita dei normali rapporti interarcata possono rendere scorretto o impossibile il posizionamento implantare, sia da un punto di vista estetico che funzionale.

In presenza di creste alveolari atrofiche è possibile, ad oggi, intervenire con due tipologie di approccio:

- posizionamento di impianti corti;
- tecniche ricostruttive.

Il ricorso a impianti corti (altezza ≤ 7 mm) consente di eseguire la riabilitazione implantare in presenza di un'altezza dell'osso alveolare e dell'osso basale residui inferiore ai canonici 8 mm senza ricorrere alla chirurgia ricostruttiva, riducendo il numero di interventi chirurgici, determinando una contrazione dei tempi operatori e, pertanto, aumentando la *compliance* del paziente.

Da una *review* di *Hagi* del 2004 emerge, tuttavia, che gli impianti corti presentano una maggiore percentuale di fallimento rispetto a quelli con altezza superiore ai 7 mm¹².

La chirurgia ricostruttiva offre attualmente numerose alternative, che hanno tutte l'obiettivo comune di:

- ripristinare una corretta morfologia delle creste edentule;
- ripristinare un volume delle creste edentule tale da garantire l'alloggiamento di impianti adeguati alle successive sollecitazioni meccaniche;
- ripristinare dei corretti rapporti scheletrici intermascellari.

Esistono varie tecniche di ricostruzione dell'osso atrofico:

- osteoinduzione;
- tecniche ad innesto;
- rigenerazione ossea guidata mediante l'utilizzo di membrane;
- ricostruzione mediante lembi liberi rivascolarizzati;

- distrazione osteogenica¹.

L'attenzione del nostro studio è rivolta alle tecniche ad innesto.

Innesti ossei

Gli innesti ossei sono classificabili, in base alla loro origine, in:

- innesti autologhi: provenienti dallo stesso individuo;
- innesti singenici: provenienti da individuo geneticamente identico;
- innesti allogenici: provenienti da individui diversi ma appartenenti alla stessa specie;
- innesti xenogenici: provenienti da individui appartenenti a specie diverse;
- innesti alloplastici: materiali di sintesi.

Le caratteristiche ideali di un materiale da innesto sono:

- biocompatibilità;
- osteoconduzione, osteoinduzione e osteogenesi;
- ottenere una rivascolarizzazione veloce e completa;
- essere eliminato dall'organismo ricevente e sostituito da osso neoformato di ottime qualità strutturali;
- facile reperibilità;
- buon rapporto costi/benefici.

Di seguito, vengono analizzate le tre proprietà fondamentali.

Osteoconduzione, osteoinduzione e osteogenesi

L'osteoconduzione è la capacità dell'innesto di fungere da impalcatura per consentire la neoformazione ossea: l'innesto viene gradualmente invaso da gettoni vascolari che apportano cellule osteoprogenitrici dal circolo ematico e dalla periferia, favorendo una progressiva sostituzione dell'innesto stesso con osso neoformato dalla periferia verso il centro. Hanno capacità osteoconduttiva tutti i materiali sopracitati.

L'osteoinduzione è la capacità di un tessuto di indurre la differenziazione di cellule mesenchimali pluripotenti, provenienti dal sito ricevente o dal circolo ematico, in osteoblasti, stimolando la neogenesi ossea a livello sia dell'innesto che del sito ricevente.

Questa attitudine è data dalla liberazione, da parte dell'innesto, di messaggeri biochimici inducenti la differenziazione ossea, tra cui, le Bone

Morphogenetic Proteins (BMPs). Presentano caratteristiche osteoinduttive l'osso autologo e l'osso allogenico.

L'*osteogenesi* è la capacità delle cellule osteogeniche sopravvissute presenti nell'innesto di produrre nuovo osso. È una caratteristica esclusiva dell'osso autologo.

Comprendiamo bene come l'osso autologo, racchiudendo in sé proprietà osteoconduttive, osteoinduttive e osteogenetiche sia unanimemente considerato il *gold standard* negli interventi di ricostruzione ossea periimplantare. Gli innesti valutati nella parte sperimentale di questa trattazione sono di tipo autologo non vascolarizzato e ad essi saranno limitate le considerazioni che seguono.

Biologia degli innesti ossei non vascolarizzati

Dopo l'innesto dell'osso nel sito ricevente inizia la guarigione, caratterizzata dal susseguirsi di una serie di processi biologici che portano all'attecchimento finale dell'innesto.

Questi processi biologici possono essere così riassunti:

- Formazione di un ematoma attorno all'innesto provocato dal sanguinamento delle ferite chirurgiche del sito ricevente. In questa fase iniziale solo una piccola quantità di cellule innestate, quelle periferiche, rimangono vitali grazie all'imbibizione plasmatica ed alla precoce rivascolarizzazione.
- Intorno al 5°-7° giorno compare una risposta infiammatoria intorno all'innesto che si riorganizza in uno stroma denso fibrovascolare.
- Fra il 10°-15° giorno si assiste alla progressiva invasione vascolare con andamento centripeto. Il tessuto necrotico derivato dall'autolisi cellulare viene rimosso dalle cellule macrofagiche e gli spazi liberi vengono riempiti da gettoni vascolari che portano cellule mesenchimali primitive con potenziale osteogenico.
- Nelle zone raggiunte dai gettoni vascolari neoformati ha inizio la fase di deposizione ossea. Gli osteoblasti e gli osteoclasti sopravvissuti nell'innesto e quelli originati dalla differenziazione delle cellule progenitrici portate dal torrente ematico, cominciano a sostituire l'innesto. Questi eventi sono influenzati da fenomeni di

osteoconduzione, osteoinduzione ed osteogenesi che agiscono in vario modo nelle fasi di guarigione e perdurano fino a quando non si ha la completa rivascolarizzazione e sostituzione ossea dell'innesto.

- L'innesto completamente sostituito da osso neoformato è soggetto al fenomeno del rimodellamento, dovuto all'influenza delle sollecitazioni meccaniche dell'ambiente che circonda l'innesto.

Fattori condizionanti la sopravvivenza dell'innesto

I fattori che influenzano il potenziale osteogenico dell'innesto possono essere distinti in fattori propri dell'innesto e fattori non propri dell'innesto.

Fattori propri dell'innesto:

- posizione dell'innesto (*inlay, onlay*);
- microarchitettura ossea (corticale, spongiosa);
- modalità di conservazione dell'innesto;
- modalità di prelievo;
- orientamento dell'innesto.

Fattori non propri dell'innesto:

- sito ricevente;
- metodo di fissazione al sito ricevente;
- stress biomeccanici;
- tasso di rivascolarizzazione.

Posizione dell'innesto

Gli innesti ossei in base alla posizione assunta nel sito ricevente possono essere distinti in:

- innesti di apposizione o *onlay grafts*;
- innesti di interposizione o *inlay grafts*.

Gli innesti di apposizione hanno una sola superficie di contatto col sito ricevente perché sono semplicemente adagiati su di esso. Gli innesti di interposizione sono invece alloggiati in vere e proprie cavità ritentive per cui contattano il sito ricevente in corrispondenza di più pareti, assumendo con esso un rapporto più intimo.

L'innesto ad *onlay* viene rivascolarizzato con più difficoltà rispetto a quello ad *inlay* perché presenta una minore superficie di contatto con l'osso ricevente ed è maggiormente soggetto a sollecitazioni traumatiche che ne favoriscono il riassorbimento.

Gli innesti ad *inlay* sono, invece, maggiormente e più velocemente rivascolarizzati per la maggiore superficie di contatto con l'osso nativo, non sono soggetti a traumi fisici del lembo di copertura, perché protetti

dalle pareti del sito ricevente che ne assicurano, inoltre, una stabilità ottimale.

Microarchitettura

Le caratteristiche ultrastrutturali dell'innesto sembrano influenzare le fasi biologiche della guarigione degli innesti non vascolarizzati.

L'innesto osseo midollare è rivascolarizzato completamente e più rapidamente rispetto all'osso corticale poiché la presenza di larghi spazi tra le trabecole ossee non oppone resistenza all'insinuarsi dei vasi sanguigni neoformati. La graduale rivascolarizzazione degli innesti spongiosi da parte dei vasi provenienti dal letto ricevente si completa normalmente nell'arco di alcune settimane e, già dopo le prime ore, il nutrimento delle cellule innestate è garantito anche in profondità dal fenomeno della riperfusione. Contemporaneamente all'invasione vascolare dell'innesto arrivano cellule mesenchimali indifferenziate che ricoprono le trabecole ossee, si differenziano in osteoblasti e depositano uno strato osteoide attorno ad un nucleo centrale di osso necrotico. Le aree necrotiche intrappolate nel tessuto osseo neoformato vengono gradualmente riassorbite dall'attività osteoclastica e rimpiazzate anch'esse in modo completo da nuovo tessuto osseo.

L'innesto osseo corticale è rivascolarizzato più lentamente e alcune volte in modo incompleto. La rivascolarizzazione è limitata dalla densa struttura lamellare e i vasi neoformati possono penetrare nell'innesto soltanto attraverso i preesistenti canali di *Volkman* e di *Havers*, dalla periferia dell'innesto verso il suo interno. Non si nota penetrazione di vasi durante la prima settimana e la completa rivascolarizzazione può richiedere anche diversi mesi o non completarsi mai. La riparazione dell'innesto corticale inizia dall'attività osteoclastica con precoce riassorbimento dei sistemi haversiani periferici necrotici a cui segue il riassorbimento della corticale più interna. Dove si è avuto riassorbimento osseo compaiono gli osteoblasti che depositano matrice osteoide. Nell'innesto corticale, l'inizio della fase di apposizione avviene prima che l'osso necrotico sia stato completamente rimosso. Queste aree necrotiche circondate da un alone di riassorbimento e da osso periferico neoformato assumono l'aspetto di sequestri ossei. L'innesto corticale perde circa il 60% della normale resistenza per alcuni mesi dopo il suo posizionamento in quanto la

riparazione inizia con processo di riassorbimento osteoclastico che ne aumenta la porosità interna^{13,14}.

Modalità di conservazione dell'innesto

É opportuno evitare stimoli osmotici ed essiccamento dell'innesto, conservandolo in soluzione fisiologica previo lavaggio atto ad escludere la contaminazione batterica e salivare, pericolosa per la presenza di enzimi litici.

Modalità di prelievo

L'innesto può essere prelevato in blocco o in particolato: la scelta viene effettuata sulla base di un'accurata valutazione preoperatoria del difetto da colmare.

Nell'innesto in blocco, la sopravvivenza cellulare è significativamente maggiore e non sussiste la necessità di posizionare membrane.

Esso, tuttavia, risulta scarsamente adattabile al sito ricevente e presenta un maggior rischio di esposizione.

Nell'innesto in particolato, la sopravvivenza cellulare è certamente inferiore essendo il prelievo effettuato con *bone scrapers*, tuttavia presenta un maggior effetto osteoconduttivo, che consente una più rapida rivascolarizzazione e una completa sostituzione in osso vitale.

Orientamento dell'innesto

In presenza di innesti ossei di tipo cortico-midollare si prospetta l'alternativa dell'orientamento dell'innesto rispetto al sito ricevente.

In teoria la midollare a contatto col sito ricevente dovrebbe favorire una maggiore e precoce rivascolarizzazione dell'innesto, così come la corticale, posta in interfaccia coi tessuti molli sovrastanti, oltre a ripetere la naturale disposizione dell'osso, dovrebbe preservare l'innesto dagli stress dei tessuti molli sovrastanti. Questa ipotesi è stata confutata da *Hardesty e Marsh* nel 1990¹⁵ che sostengono che il posizionamento dell'innesto non è in grado di condizionarne la sopravvivenza. Non esiste un parere unanime sull'argomento in letteratura e i risultati risultano spesso controversi.

Sito ricevente

Il sito ricevente gioca un ruolo molto importante sul destino dell'innesto poiché risulta particolarmente attivo nelle fasi di guarigione.

Le caratteristiche del letto ricevente in grado di influenzare la sopravvivenza dell'osso innestato sono:

- posizione del sito ricevente rispetto all'osso innestato (*onlay* o *inlay*);
- presenza di una interfaccia sufficientemente ampia da favorire la stabilità dell'innesto e la vascolarizzazione;
- presenza di un sufficiente strato di osso corticale nativo che consenta la fissazione rigida;
- presenza di una adeguata vascolarizzazione.

Metodo di fissazione al sito ricevente

La fissazione rigida^{16,17,18} garantisce una maggiore affidabilità di attecchimento al sito ricevente consentendo all'innesto di svolgere la sua duplice funzione meccanica ed osteogenetica. L'assenza di mobilità dell'innesto è indispensabile affinché non si venga a creare un *gap* tra innesto e sito ricevente, che, guarendo per seconda intenzione, determinerebbe la formazione di tessuto connettivale (pseudoartrosi).

Stress biomeccanici

Diversi autori hanno messo in relazione le evidenze cliniche dei riassorbimenti degli innesti ossei con l'interferenza degli stress meccanici subiti dall'innesto. Queste evidenze cliniche hanno per il momento un esclusivo supporto empirico basato sulla legge di *Wolff*⁴ mai dimostrata, secondo la quale l'architettura dell'osso si rimodella in relazione alle forze ad esso applicate e ogni volta che si modifica la funzione dell'osso cambiano anche la sua architettura interna ed esterna. In particolare sono indiziati come fattori traumatici favorenti il riassorbimento dell'innesto, la tensione del lembo di copertura, i traumi muscolari al livello del sito ricostruito, i traumi di protesi provvisorie nella fase di guarigione dell'osso.

Tasso di rivascolarizzazione

Abbiamo già visto che la microarchitettura è un elemento determinante per il grado di rivascolarizzazione, nell'osso midollare gli ampi spazi tra le

trabecole ossee consentono una più completa e più rapida rivascolarizzazione; nell'osso corticale le fitte lamelle ossee ostacolano il percorso dei vasi, che sarà pertanto limitato ai canalicoli di *Volkman* e di *Havers*.

Se da una parte l'osso midollare rivascolarizza precocemente e maggiormente, dall'altra è più soggetto al rischio di riassorbimento in presenza di forze compressive. Gli stress meccanici agenti sull'osso possono indurre un maggiore o minore riassorbimento a seconda della maggiore o minore quantità di cellule vitali presenti nell'osso stesso, essendo il riassorbimento mediato proprio dall'attività di queste cellule, a sua volta favorita dal grado di vascolarizzazione e pertanto maggiore nell'osso midollare. Anche la maggiore o minore vascolarizzazione del sito ricevente può influire sui processi di rivascolarizzazione e quindi sul riassorbimento dell'innesto¹⁹.

Principali siti di prelievo dell'osso autologo

La ricostruzione dei mascellari atrofici, a finalità implantare, mediante innesti ossei non vascolarizzati è stata descritta originariamente da Brånemark (1975)²⁰ ed è ormai diventata una procedura consolidata e prevedibile.

L'osso autologo può essere prelevato da sedi intraorali o extraorali.

Fra i siti intraorali:

- sinfisi mentoniera;
- branca ascendente della mandibola;
- trigono retromolare;
- tuber maxillae.

Fra quelli extraorali:

- cresta iliaca;
- piatto tibiale;
- coste;
- calvaria.

Le sedi di prelievo intraorali offrono diversi vantaggi rispetto alle sedi extraorali, come il più agevole accesso chirurgico, la contrazione dei tempi operatori, la mancanza di cicatrici cutanee e la ridotta morbilità, ma consentono di prelevare quantità limitate di osso.

La scelta della sede di prelievo dipende essenzialmente dalle dimensioni del difetto osseo. In presenza di deficit di dimensioni ridotte, trovano indicazione i prelievi intraorali mentre in presenza di difetti considerevoli, i prelievi extraorali.

I siti donatori si distinguono anche per la differente qualità di osso:

- innesto osseo spongioso: pur essendo prelevabile da sedi donatrici intraorali, come la tuberosità mascellare, riconosce come principali fonti la cresta iliaca e la metafisi prossimale della tibia;
- innesto osseo cortico-spongioso: principale donatore è la cresta iliaca;
- innesto osseo prevalentemente corticale: la sinfisi e il ramo mandibolare forniscono un innesto prevalentemente corticale, ma

la sede che possiede la maggior quantità di osso lamellare è la teca cranica.

Prelievo da cresta iliaca

I primi autori a descrivere l'utilizzo di innesti ossei a finalità implantare provenienti dalla cresta iliaca furono *Kratochvil e Boyne* nel 1972²¹ e successivamente *Breine e Brånemark* nel 1980²². Il principale vantaggio del prelievo da cresta iliaca è dato dal grande quantitativo osseo prelevabile, sufficiente per il ripristino delle dimensioni dei due terzi del mascellare o del mandibolare atrofici nonché dalla buona accessibilità chirurgica. L'osso prelevato ha caratteristiche cortico-midollari con preponderante componente midollare.

Vantaggi:

- discreta plasticità e adattabilità al sito ricevente;
- buona accessibilità chirurgica;
- possibilità di prelievi di grandi dimensioni, sia spongiosi che corticali.

Svantaggi:

- maggiore morbilità rispetto ai prelievi intraorali;
- necessità di ospedalizzare il paziente;
- necessità di eseguire l'intervento in anestesia generale;
- compromissione della deambulazione per almeno un mese;
- permanenza di una cicatrice cutanea di modeste dimensioni²².

La cresta iliaca costituisce il margine superiore dell'osso iliaco, facente parte delle ossa del bacino, origina anteriormente dalla spina iliaca antero-superiore e si porta posteriormente fino alla spina iliaca postero-superiore. Sulla spina iliaca anteriore si inseriscono i muscoli sartorio, tensore della fascia lata e il legamento inguinale. Sul labbro esterno della cresta trovano inserzione i muscoli gluteo medio e piccolo gluteo. Sul labbro interno si inseriscono i muscoli obliquo interno, trasverso dell'addome e il muscolo iliaco. Per quanto riguarda le strutture vascolari, la circolazione arteriosa del bacino è assicurata dalle arterie iliache esterna e interna. Nella sede di prelievo non sono presenti vasi di grosso calibro e i tronchi arteriosi di interesse chirurgico sono rappresentati dall'arteria circonflessa iliaca profonda e da quella superficiale. I nervi di interesse chirurgico sono il nervo ileo-inguinale, ileo-ipogastrico e femoro-cutaneo

laterale della coscia. Le sedi iliache di prelievo possono essere localizzate a livello dell'ileo anteriore o posteriore. La più utilizzata è l'area iliaca mediale anteriore.

L'innesto prelevato dalla cresta iliaca è stato ottenuto seguendo la tecnica descritta da Grillon²³ modificata da Politi²⁴ usando un approccio cutaneo attraverso le linee elettive di incisione.

Sulla cute dell'area iliaca designata al prelievo vengono tracciate preventivamente dal chirurgo due o tre linee elettive che individuano il naturale andamento delle pieghe cutanee. La loro identificazione avviene con paziente in piedi e chinato in avanti col busto. Una di queste linee sarà poi scelta in sede operatoria come linea di incisione per accedere all'area di prelievo. Vengono poi tracciate altre linee di repere, in particolare la posizione della spina iliaca antero-superiore e il decorso della cresta iliaca. La spina iliaca anteriore costituisce un limite chirurgico invalicabile per non incorrere nel rischio di ledere l'arteria iliaca circonflessa superficiale, il nervo femoro-cutaneo laterale ed il legamento inguinale. Scelta la linea elettiva ad una distanza di sicurezza dalla spina iliaca antero-superiore, si procede lungo questa all'incisione dei tessuti che avviene per piani, fino al coinvolgimento dello strato adiposo profondo e all'esposizione del piano muscolare. A questo livello è modificato il piano di incisione che passa da perpendicolare alla cresta a parallelo. L'incisione del piano aponevrotico muscolare fino all'osso è fatta lungo la cresta per una lunghezza proporzionale alla quantità di osso da prelevare. Si procede alla scheletrizzazione dell'area di prelievo in direzione antero-mediale con distacco dei muscoli addominali ed iliaco. La fase osteotomica descritta da Politi prevede la realizzazione di un coperchio osseo crestale con cerniera laterale (*trap-door*) al di sotto del quale viene eseguito il prelievo *en-block* cortico-midollare. Il coperchio viene poi riposizionato andando a ripristinare la normale morfologia crestale con minor *discomfort* per il paziente. Il coperchio è realizzato con scalpelli e/o frese reciprocanti con tre linee osteotomiche, due perpendicolari alla cresta e una, di congiunzione, lungo il labbro mediale crestale. Facendo leva con gli scalpelli inseriti nell'incisione di congiunzione si ribalta lo sportello lateralmente. Il quarto lato subisce una frattura a legno verde senza dislocazione delle parti, tenute insieme dalla persistenza del periostio. Si eseguono i fori dove passerà il filo da osteosintesi per il riposizionamento

dello sportello. Esso poggerà su due gradini laterali realizzati riducendo la dimensione del prelievo rispetto al coperchio. Le osteotomie delimitanti il blocchetto sono realizzate con scalpelli e/o seghe reciprocanti sulla corticale della faccia crestale mediale, con prolungamento delle linee oltre il loro punto di incontro, per evitare la formazione di pericolose cricche ossee durante la fase finale del prelievo che avviene con l'inserzione di scalpelli in profondità, nella midollare esposta dal ribaltamento dello sportello. Questa tecnica fornisce un osso prevalentemente midollare poiché la maggiore quantità di componente corticale, presente nello sportello crestale, non viene prelevata. Dopo il riposizionamento del coperchio con fili da osteosintesi si procede alla sutura della ferita con fili riassorbibili, a punti staccati e portata avanti per piani fino a quello cutaneo. Può essere utile l'applicazione di un drenaggio se il sanguinamento nelle fasi chirurgiche si dimostra abbondante.

Tecniche di innesto

Il posizionamento dell'innesto a livello del sito ricevente è strettamente legato al tipo di difetto osseo e alla necessità di ripristinare un'altezza e/o uno spessore adeguati per assicurare la stabilità implantare primaria.

A seconda della posizione, gli innesti vengono suddivisi in:

1. *Onlay Grafts* o innesti di apposizione:
 - *Veneer* o innesti di apposizione orizzontale;
 - *Occlusali* o innesti di apposizione verticale;
2. *Inlay grafts* o innesti di interposizione.

Innesti di apposizione orizzontale

Trovano indicazione in presenza di un'adeguata altezza della cresta alveolare ($\geq 7\text{mm}$) e di uno spessore insufficiente al posizionamento degli impianti ($< 6\text{mm}$)²⁵. La scelta della sede di prelievo e del tipo di innesto dipendono dalle dimensioni del difetto.

La tecnica prevede il posizionamento dell'innesto direttamente sulla cresta alveolare messa a nudo, a seguito dello scollamento di un lembo muco periosteale, in modo tale da realizzare un incremento orizzontale della cresta edentula. L'innesto deve, quindi, essere fissato rigidamente e può avvalersi o meno dell'uso di membrane.

Requisito locale fondamentale è la presenza di tessuti molli ben vascolarizzati e di una sufficiente quantità di mucosa cheratinizzata²⁶.

Innesti di apposizione verticale

La tecnica prevede il posizionamento dell'innesto direttamente sulla cresta alveolare messa a nudo, dopo aver scollato un lembo muco periosteale, in modo da incrementare la dimensione verticale della cresta edentula²⁶.

Gli innesti di apposizione verticale sono indicati nelle creste di adeguato spessore (> 6 mm), ma di altezza insufficiente (<7 mm) al posizionamento di impianti²⁷, nei difetti post-traumatici o post-oncologici con resezione del bordo alveolare mandibolare o mascellare e nei casi di aumentata distanza interarcata. Sono controindicati nel caso di insufficiente quantità o qualità dei tessuti molli del letto ricevente.

Grande rialzo del seno mascellare (Sinus Lift)

Nella regione mascellare posteriore, l'inadeguato volume osseo è spesso il risultato della combinazione di un'iperpneumatizzazione del seno mascellare e di un'atrofia crestale post-estrattiva.

Un volume osseo sufficiente può essere ricreato mediante diverse tecniche di innesto. La tecnica chirurgica di base, in grado di risolvere il problema dell'atrofia ossea e di fornire un volume osseo adeguato per il posizionamento implantare è il "grande rialzo del seno mascellare" (*sinus lift*), descritto inizialmente da Boyne & Coll. e da Tatum²⁸.

Di seguito viene descritto la tecnica chirurgica utilizzata nel nostro studio. Un'attenta valutazione pre-operatoria tramite TC-dentascan risulta fondamentale per evidenziare le caratteristiche anatomiche del seno

La tecnica chirurgica adottata prevede un approccio laterale mediante realizzazione di una botola di accesso al seno mascellare, sovrastante la regione premolare/molare. Come suggerito da Sailer²⁹, è stata eseguita la completa rimozione della membrana sinusale e il successivo posizionamento di un innesto a blocchetto prelevato da cresta iliaca, che è stato posizionato sul pavimento del seno mascellare e rigidamente fissato al sito ricevente mediante viti da osteosintesi.

Sono state eseguite un'incisione orizzontale mediocrestale e due incisioni verticali di rilascio nella sede da ricostruire, scollando un lembo a spessore totale e esponendo un ampio sito chirurgico dalla fossa canina al pilastro zigomatico mascellare laterale. La parete laterale del seno mascellare è stata ampiamente aperta: la linea di osteotomia inferiore è stata posizionata a livello del pavimento del seno mascellare; la linea di

osteotomia superiore è stata realizzata ad un'altezza tale da permettere un accesso adeguato per il posizionamento dell'innesto. Le linee osteotomiche anteriore e posteriore sono state eseguite ai bordi del seno mascellare. La parete laterale del seno, prima della rimozione, è stata preparata per ospitare 2 miniplacche da osteosintesi posizionate ai lati opposti. Dopo la rimozione, l'ampia botola ossea, privata della membrana Schneideriana è stata posta in soluzione fisiologica sterile. L'innesto prelevato da cresta iliaca è stato posizionato come Grillon & Coll²³. Il blocchetto osseo cortico-midollare è stato sagomato in modo da adattarlo al seno mascellare. Una volta ottenuta la forma finale, l'innesto è stato posizionato nel seno e fissato con viti da osteosintesi. La botola ossea, fissata nella sua posizione originaria, è stata ricoperta da mucosa orale, mobilizzata tramite incisioni orizzontali periostali di Rehrmann, senza tensioni sull'innesto.

Obiettivi dello studio

Fase Clinico-Radiografica

- Analizzare e determinare i cambiamenti volumetrici e lineari di innesti a blocchetto ad *inlay* e ad *onlay* utilizzati per il trattamento di gravi atrofie mascellari e mandibolari, a finalità implanto-protesiche.
- Scoprire la possibile correlazione tra il rimodellamento osseo e le caratteristiche tridimensionali dell'innesto (superficie esterna dell'innesto, superficie di contatto tra innesto e sito ricevente) e del sito ricevente (volume dell'osso basale).

Fase Analisi Genica

- Eseguire un'identificazione *de novo* dei geni coinvolti nei processi di rimodellamento osseo e definire i geni *leader*.
- Acquisire informazioni iniziali riguardanti le basi molecolari e la funzione di ciascuno dei geni identificati.
- Pianificare futuri esperimenti *ad hoc*.

Materiali e metodi Fase Clinico-Radiografica

Trattamento chirurgico

Nel corso di questo studio sono state prese in esame aree posteriori mandibolari e mascellari caratterizzate da gravi atrofie ossee verticali e aree anteriori mascellari caratterizzate da gravi difetti verticali e orizzontali che rendevano impossibile una riabilitazione implanto-protesica.

Nella mandibola posteriore, si è ricorso all'incremento osseo verticale in presenza di un'altezza disponibile minore di 7 mm²⁷ misurata a partire dal canale mandibolare. Nella regione frontale mascellare, si è ricorso a tecniche di incremento orizzontali in presenza di uno spessore crestale residuo inferiore ai 6 mm, associato ad un'adeguata altezza ossea²⁵. L'intervento di innesto osseo autologo verticale o orizzontale è stato realizzato secondo la procedura descritta da *Triplett & Schow*²⁶.

Nel mascellare superiore posteriore, si è ricorso alla chirurgia ricostruttiva in presenza di un'altezza inferiore ai 3 mm³⁰, misurata a partire dal pavimento del seno mascellare.

Come sito donatore, nelle procedure di innesto osseo si è ricorso alla cresta iliaca, seguendo la tecnica usata da *Grillon*²³, che prevede un approccio cutaneo tramite il disegno di linee elettive di incisione.

Prima di procedere alla fase chirurgica, è stato eseguito uno studio del caso basato sull'esame clinico intra-orale ed extra-orale, sulla valutazione chirurgico-protesica mediante ceratura diagnostica e sull'esame TC dentascan eseguito con una dima individuale radiologico-chirurgica: in nessun caso è stata riscontrata una quantità ossea tale da permettere il posizionamento immediato degli impianti.

L'atrofia ossea era il risultato di una condizione di edentulia perdurante da diversi anni trattata tramite protesi rimovibile, di una perdita di osso alveolare dovuta a malattia parodontale oppure di traumi maggiori. Nessun paziente aveva subito interventi di resezione ossea come parte di un trattamento oncologico.

Sinus Lift

Prima dell'intervento, tutti i seni mascellari dovevano essere privi di segni patologici, vale a dire di qualsiasi segno clinico di sinusite e/o di segni radiografici di patologia localizzata, identificata come ispessimento della membrana sinusale (≥ 3 mm) alle scansioni TC. In caso di patologia sinusale, i pazienti sono stati sottoposti ad endoscopia nasale seguita da terapia medica con chemio-antibiotici e corticosteroidi appropriati, e, se richiesto, a chirurgia endoscopica funzionale dei seni paranasali (FESS).

La chirurgia incrementale è stata sempre realizzata in anestesia generale con intubazione naso-tracheale accompagnata da infiltrazione locale di anestetico (mepivacaina al 2%) con vasocostrittore (adrenalina) per ridurre il sanguinamento. La copertura antibiotica era garantita dalla somministrazione un'ora prima dell'intervento di 1 g di amoxicillina in associazione con acido clavulanico per via endovenosa.

Gli innesti ossei autologhi a blocchetto sono stati prelevati dall'area iliaca mediale anteriore.

Il sito ricevente è stato approcciato mediante la tecnica di Sailer²⁹, usando un innesto in blocchetto.

In una seconda fase chirurgica, 5 mesi dopo l'intervento di ricostruzione ossea, nelle aree ricostruite sono stati posizionati impianti osteodentari in titanio.

Innesti ad *onlay* mascellari e mandibolari

Il sito ricevente è stato approcciato come descritto da Triplett e Schow²⁶. Per l'accesso alla superficie occlusale della regione mascellare anteriore e della mandibola posteriore è stato allestito un lembo muco-periosteo con incisione paracrestale.

Dopo aver eseguito uno scollamento a tutto spessore ed aver esposto la corticale sia vestibolare che linguale, l'innesto è stato modellato e adattato al letto ricevente. Si è ricorso ad innesti ossei autologhi prelevati dalla cresta iliaca.

Il sito ricevente è stato preparato mediante perforazioni multiple per favorire la penetrazione vascolare dell'innesto durante l'attecchimento.

Gli innesti ossei a blocchetto, una volta posizionati ad *onlay* sulla superficie occlusale della cresta edentula, sono stati fissati per mezzo di viti da osteosintesi (lunghezza da 7 a 15 mm e diametro 2 mm) con tecnica *lag-screw*³¹, per garantire il contatto diretto innesto-sito ricevente. Sono stati utilizzati frammenti di osso autologo per colmare i difetti tra innesto e area ricevente.

È stata eseguita una plastica di *Rehrmann*³² per eliminare le tensioni del lembo sull'innesto e si è proceduto alla sutura con punti a "U" di Donati.

Durante la seconda fase chirurgica, realizzata dopo circa 3-5 mesi dalla fase incrementale, si è proceduto alla riapertura del sito per rimuovere i mezzi di sintesi e per il posizionamento implantare.

Trattamento post-operatorio

A tutti i pazienti è stata somministrata una terapia antibiotica a base di amoxicillina ed acido clavulanico per almeno 5 giorni associata ad antinfiammatori e antidolorifici al bisogno. Nei venti giorni successivi, è stata prescritta una dieta liquida/semiliquida ed è stato fatto divieto di indossare protesi per favorire la guarigione della mucosa. Ai pazienti sottoposti a grande rialzo del seno mascellare, è stata sconsigliata qualsiasi manovra in grado di aumentare la pressione nelle cavità sinusali, come il soffiarsi il naso. L'igiene orale è stata mantenuta con sciacqui di clorexidina digluconato allo 0,12%.

Chirurgia implantare

Dopo un periodo di guarigione di 3-5 mesi, è stato eseguito un esame TC dentascan con una nuova dima radiologico-chirurgica per programmare il posizionamento degli impianti osteodentari.

In seguito a tale esame, i pazienti sono stati sottoposti ad un nuovo intervento chirurgico in anestesia generale per la rimozione delle viti da osteosintesi ed il posizionamento, nelle aree innestate, di impianti dentari in titanio con tecnica sommersa.

Gli impianti inseriti erano endossei, cilindrici a vite, con connessione ad esagono esterno e con superficie ruvida (out-Link® PRO-Link® Sweden & Martina, Due Carrare, PD Italia).

Tra i cinque e gli otto mesi dopo il posizionamento implantare, si è provveduto alla valutazione clinica dell'osteointegrazione e al posizionamento delle viti di guarigione mediante mucotomie in corrispondenza delle sedi implantari.

Dopo ulteriori 2-4 settimane, necessarie all'adattamento dei tessuti molli perimplantari, si è dato inizio alla fase protesica: sono state realizzate per tutti i pazienti protesi di tipo fisso con corone e ponti in metallo-ceramica, cementate su *abutment* metallici realizzati in laboratorio o su *abutment* tipo UCLA.

Un anno dopo il posizionamento implantare, tutti i pazienti sono stati esaminati clinicamente nel programma di mantenimento post-operatorio, testando gli impianti dentari singolarmente.

La sopravvivenza implantare è stata definita come assenza di:

- mobilità;
- radiotrasparenza perimplantare;
- infezioni o disordini neurologici³³;
- dolore associato, spontaneo o stimolato (applicando un *torque* da 10 a 20 Ncm)³⁴.

Raccolta e analisi dei dati

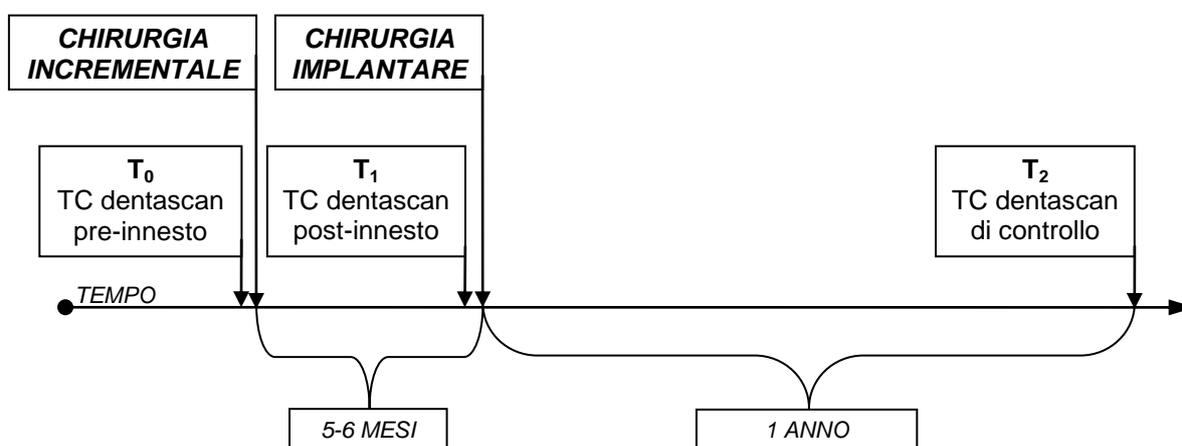
Esame radiografico

Come previsto dal protocollo standard di trattamento, tutti i pazienti sono stati sottoposti a scansioni Tomografiche Computerizzate (*High Speed double detector CT scanner, General Electric Medical System, Milwaukee, WI, USA*) come segue:

- T_0 : immediatamente prima dell'intervento di chirurgia incrementale,
- T_1 : 5-6 mesi dopo la procedura chirurgica, appena prima del posizionamento implantare,
- T_2 : ad un anno dalla chirurgia implantare.

Per una corretta acquisizione dei dati, è fondamentale il corretto posizionamento del capo del paziente.

La tecnica prevede l'esecuzione di scansioni assiali con spessore di 1 mm; la matrice di esecuzione è 512 x 512 voxel, estesa a coprire l'intera altezza dell'arcata di interesse, mentre il FOV (*Field Of View*) è variabile da 138 a 160 mm.



Metodica di calcolo di volumi e aree

Durante il protocollo di acquisizione dei dati, il posizionamento del capo del paziente è affidato esclusivamente alla manualità del tecnico; è, pertanto, molto difficile che ai diversi *time-points* si ottengano due scansioni paragonabili strato per strato.

Poiché il nostro scopo è proprio quello di paragonare le scansioni assiali per effettuare sottrazioni volumetriche, la teorica sovrapposizione delle matrici TC, $512 \times 512 \times n$ (dove n è il numero delle assiali), è passata necessariamente per una riallocazione della matrice di voxel. I file DICOM originali sono stati alterati in modo che tutti quelli appartenenti allo stesso paziente a T_0 , T_1 e T_2 avessero lo stesso valore di FOV. Questa operazione è stata possibile utilizzando il listato *resize* (*appendice A*) su piattaforma *MATLAB 7.0.1*, il quale sfrutta un ridimensionamento della matrice $512 \times 512 \times n$ di tipo "bilineare". La matrice tridimensionale a 12 bit del file originale viene anche trasformata in matrice a 16 bit, in maniera tale che risultino più agevoli le ulteriori modifiche (*Figura 1*).

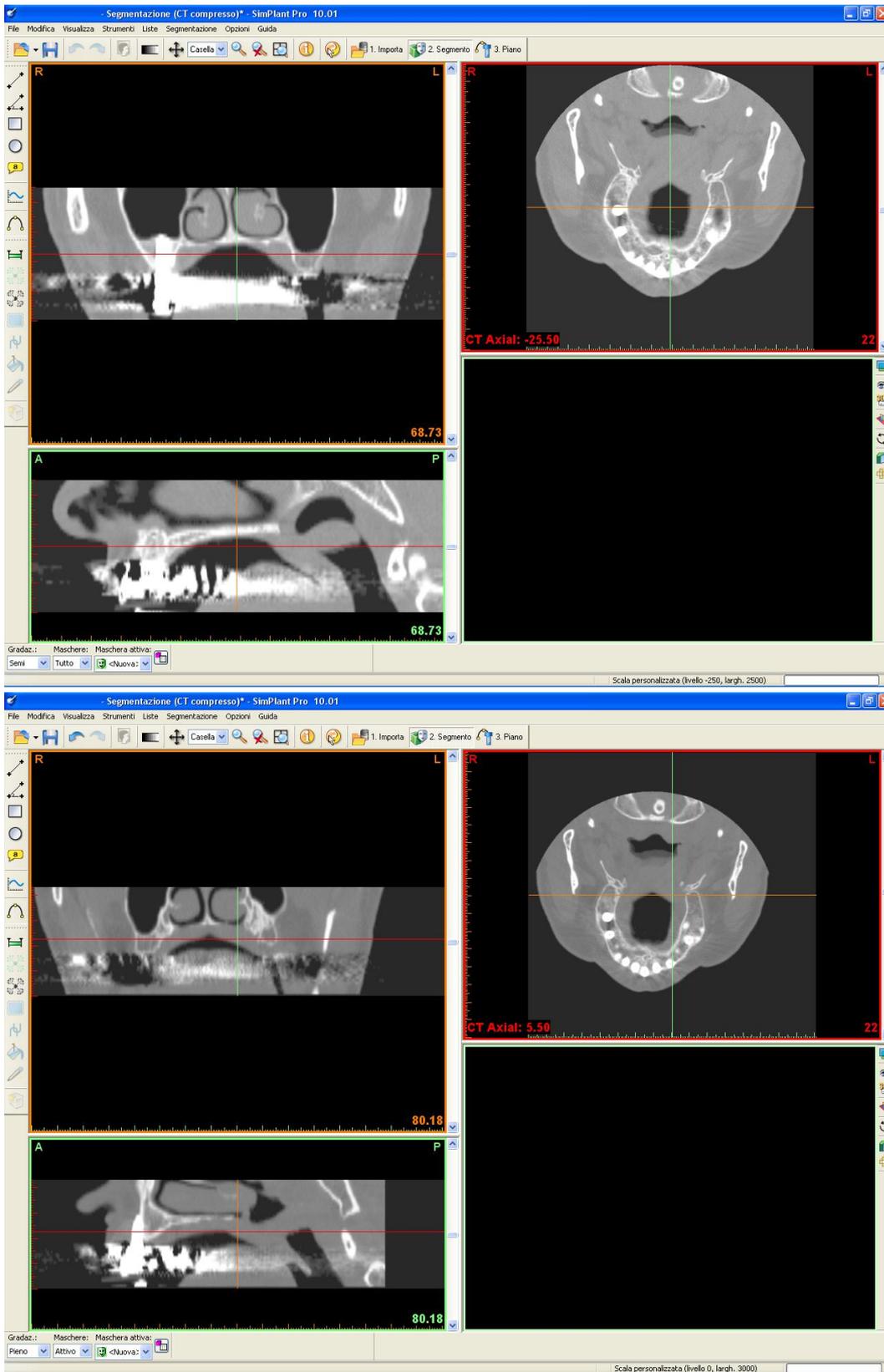


Figura 1. Operazione di resize da FOV 137,78 mm a FOV 160,69.

Per una sovrapposizione teorica di due matrici ottenute da due scansioni a tempi differenti è stato usato il metodo delle minime distanze di un punto dai tre assi cartesiani (ortogonali tra loro).

Per la valutazione dei mascellari superiori, per ogni paziente viene costruito, in base a tre punti di repere anatomici ossei (spina nasale anteriore ed i due uncini pterigoidei, destro e sinistro), un piano mascellare (piano z); su di esso vengono costruiti un piano x, che sia ortogonale al piano z e che passi per la spina nasale anteriore e per il punto medio tra gli uncini pterigoidei, ed un piano y, ortogonale ai due piani sopracitati e passante per il punto medio dei tre punti di repere anatomici.

Per la valutazione delle mandibole, per ogni paziente è stato costruito in base a tre punti di repere (spina dello Spix destra e sinistra e punto di mezzo fra i due forami mentonieri) un piano mandibolare (piano z); su cui sono stati costruiti un piano x, ortogonale ad esso, passante per il punto medio tra le due spine dello Spix e per il punto medio tra i due forami mentonieri, ed un piano y, ortogonale ai due piani sopracitati e passante per il punto medio dei tre punti di repere.

Utilizzando il listato *reformat* (*appendice B*) su piattaforma *MATLAB 7.0.1*, ciascuna matrice di voxel viene ri-allocata spazialmente in maniera che i tre punti di repere anatomico ossei per la triangolazione tridimensionale abbiano, per lo stesso paziente, la stessa disposizione spaziale (*Figura 2*). Il listato *reformat* utilizza il file *TRIPLANE4.m* per la costruzione dei piani di riferimento e per il calcolo delle distanze che ciascun voxel ha da questi ultimi secondo l'equazione riportata in *appendice C*. Qualora necessario, per i voxel, che dopo la procedura di ri-allocamento, risultassero di valore nullo, viene utilizzato il file *ordfilt2.m* che sostituisce al valore nullo il valore medio dei voxel prossimali.

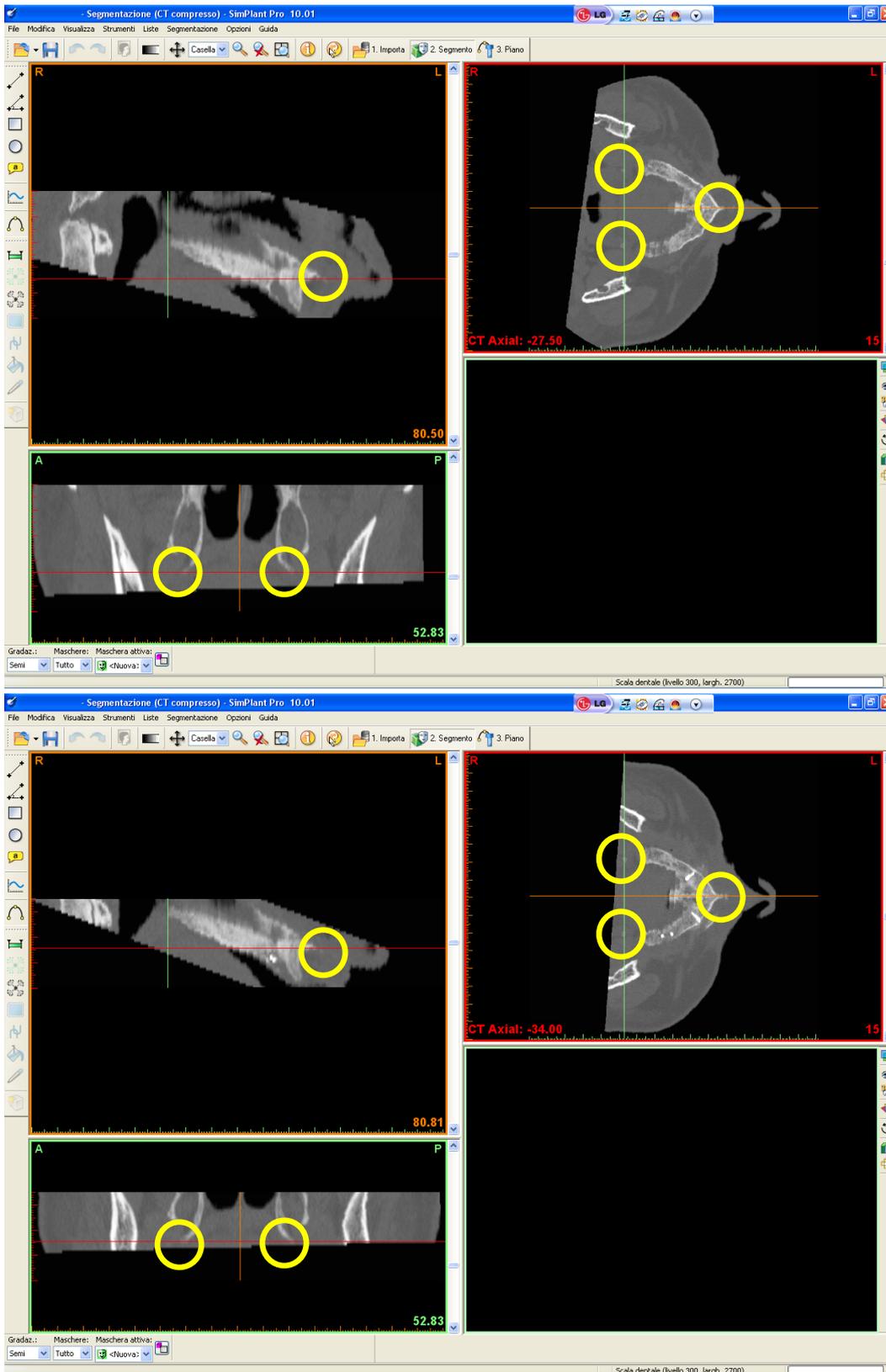


Figura 2. Operazione di reformat nel mascellare superiore. Nelle scansioni pre-operatoria T_0 e post-operatoria T_1 , i tre punti di repere anatomico non solo si trovano sulla stessa assiale ma soprattutto le loro coordinate spaziali differiscono per meno di $\frac{1}{2}$ mm (cerchi gialli).

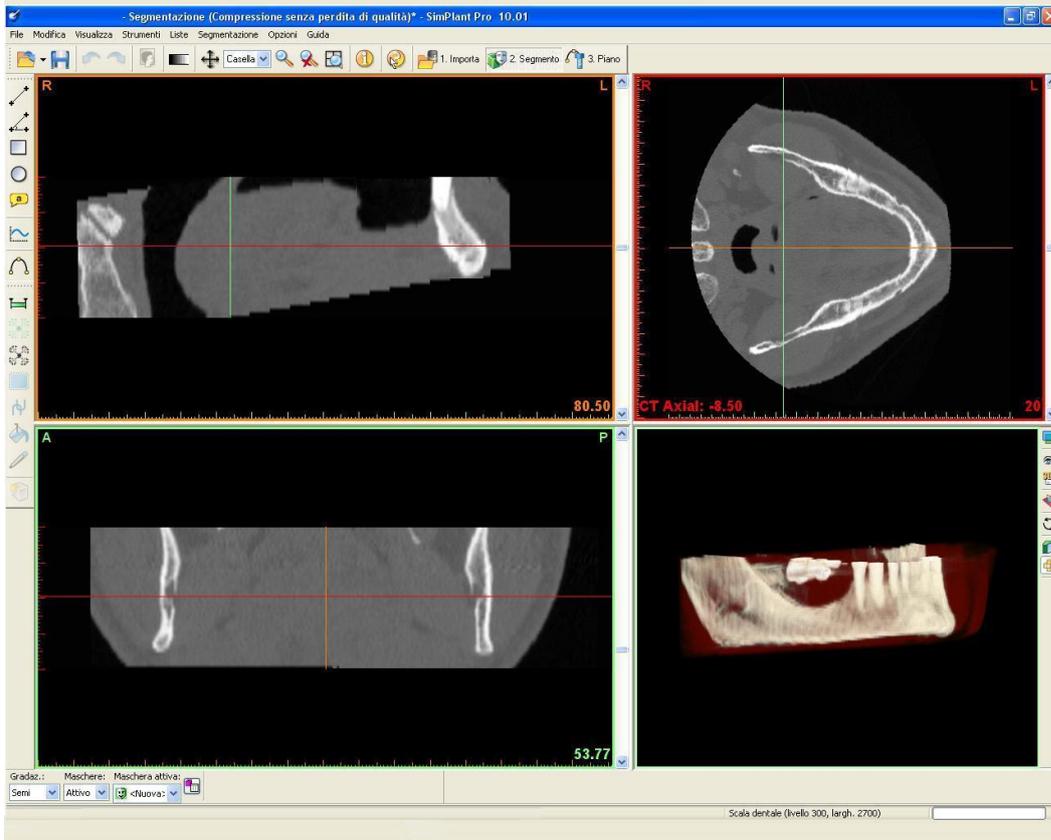
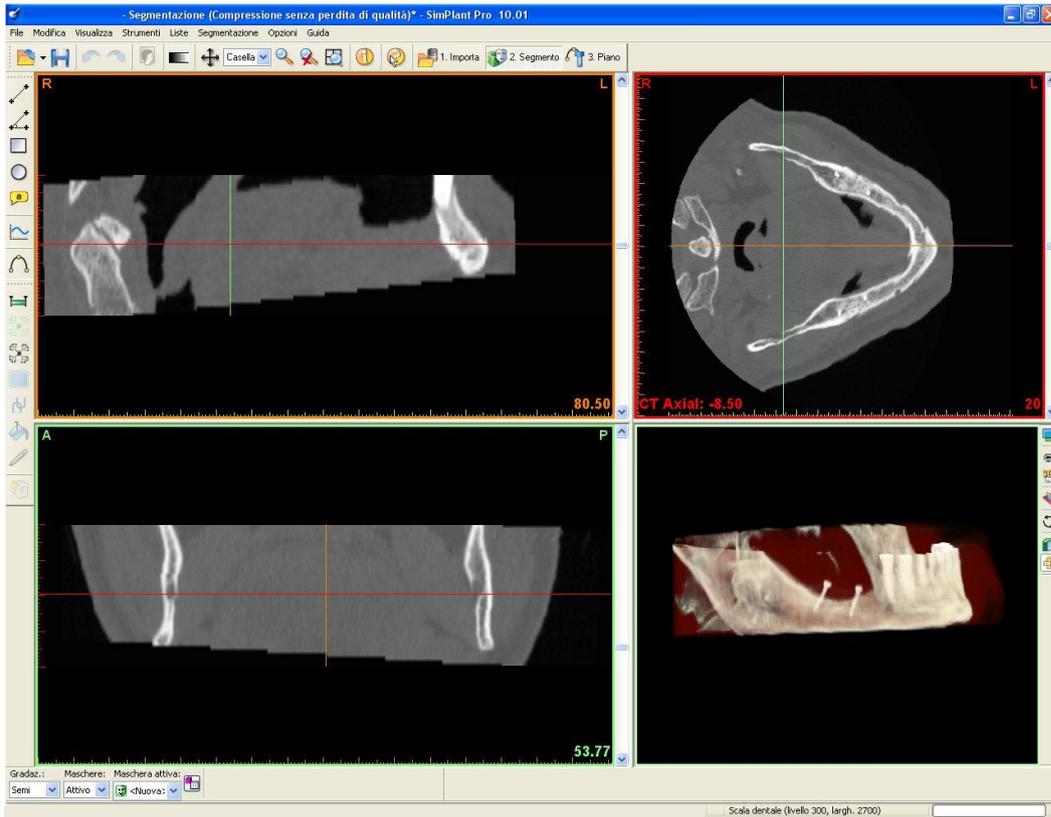


Figura 3. Operazione di reformat nella mandibola.

Le tre matrici riformattate (T_0 , T_1 e T_2) sono state salvate in formato DICOM (acronimo di *Digital Imaging for COmunication in Medicine*, con estensione .dcm) per poter essere lette ed utilizzate dal programma *SimPlant 10.01* (*Materialise Dental Italia, Via L. Fincati 13/f, 00154 Roma, Italia*). Osservando i file risultanti, si nota che le scansioni assiali sono state ruotate di 90° in senso antiorario al fine di poter facilmente distinguere i file modificati da quelli originali.

Tutte le misurazioni sono state eseguite con *SimPlant 10.01*: le misurazioni del volume, dell'area e della densità degli innesti ossei sono state eseguite come descritto da *Smolka & Coll.*³⁵ per gli *onlay*, mentre le misurazioni del rimodellamento osseo dei seni mascellari sono state eseguite come da *Krennmair & Coll.*³⁶, con un'altezza totale (TH) impostata alla massima distanza tra la cresta alveolare e la porzione apicale dell'innesto (*Figura 4*) per tutti e tre i *time-points* di riferimento.

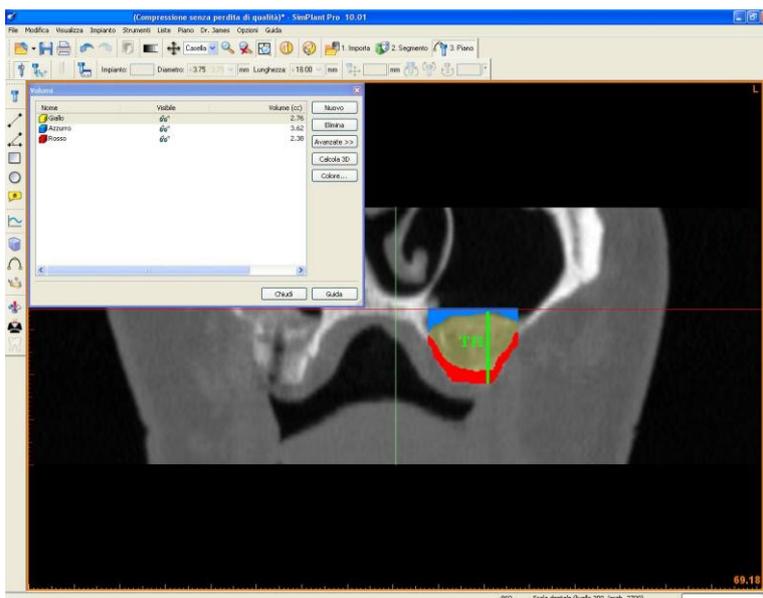


Figura 4. Calcolo del volume dell'innesto (in giallo), del volume dell'osso ricevente (in rosso) e del volume del seno mascellare vuoto (in azzurro; il limite superiore è stato impostato a TH).

Variabili misurate e derivate

Per verificare l'esistenza di una correlazione tra il rimodellamento osseo e le caratteristiche tridimensionali sia dell'osso innestato sia del sito ricevente sono state introdotte sei variabili:

Variabili dell'innesto:

- **Superficie superiore (SS_{T_1}):** superficie dell'innesto che sporge nella cavità sinusale nel caso dei rialzi di seno mascellare e superficie rivestita da periostio nel caso degli *onlay*, al tempo T_1 .
- **Indice di altezza ($indexH_{T_1}$):** rapporto tra il volume dell'osso innestato al tempo T_1 (V_{T_1}) e l'area della superficie di contatto tra l'innesto e il sito ricevente al tempo T_1 (CS_{T_1}); quest'indice dà un'indicazione riguardo allo spessore dell'innesto, se lo si osserva in un'immagine cross-sezionale:

$$indexH_{T_1} = \frac{V_{T_1}}{CS_{T_1}}.$$

- **Indice di forma ($indexS_{T_1}$):** rapporto tra il volume dell'innesto (V_{T_1}) e la sua superficie superiore (SS_{T_1}) al tempo T_1 :

$$indexS_{T_1} = \frac{V_{T_1}}{SS_{T_1}}.$$

Variabile del sito ricevente

- **Osso basale (BB_{T_1}):** volume del sito ricevente al tempo T_1 , ottenuto misurando solamente le sezioni sottostanti all'innesto.

Variabili della relazione tra innesto e sito ricevente

- **Superficie di contatto (CS_{T_1}):** superficie limite tra l'innesto e il sito ricevente al tempo T_1 .
- **Indice di volume ($indexV_{T_1}$):** rapporto tra il volume del sito ricevente al tempo T_1 (BB_{T_1}) e il volume dell'innesto al tempo T_1 (V_{T_1}), che rappresenta una variabile che unifica le caratteristiche dell'innesto e dell'osso basale:

$$\text{index}V_{T_1} = \frac{BB_{T_1}}{V_{T_1}}.$$

Variabili di risultato

- **Volume dell'osso innestato al T₁ (V_{T₁});**
- **Volume dell'osso innestato al T₂ (V_{T₂});**
- **R%:** il cambiamento volumetrico dell'innesto è stato espresso come percentuale dell'osso innestato che residua al T₂, data dal rapporto tra il volume al tempo T₂ (V_{T₂}) e il volume al tempo T₁ (V_{T₁}):

$$R\% = 100 \cdot \frac{V_{T_2}}{V_{T_1}}.$$

Correlazione, fitting e interpolazione

E' stata cercata una correlazione tra R% e le sei variabili, rappresentanti le caratteristiche tridimensionali sia dell'osso innestato che del sito ricevente.

Per la costruzione della matrice di correlazione a coppie, tra la percentuale di innesto osseo residuo (R%) e tutte le variabili suddette, è stato utilizzato il metodo di *Spearman*; in tale matrice sono compresi sia i coefficienti di correlazione (ρ) che le significatività (Sig.) relative a tali coefficienti (con un livello di significatività pari al 5%)³⁰.

Tutte le variabili che presentavano una correlazione con R% ad un livello statisticamente significativo sono state usate per la costruzione di uno *scatter plot* a due dimensioni (R% vs VARIABILE).

Inoltre, è stata eseguita una procedura di interpolazione 3-D utilizzando i valori di R% e quelli delle variabili che mostravano una correlazione statisticamente significativa con la percentuale di osso residuo al tempo T₂. Tale interpolazione è stata rappresentata come un volume nel quale il colore di ciascun tassello componente riproduce il valore di R% (rosso = minimo riassorbimento; blu = massimo riassorbimento).

Tutte le analisi di correlazione, il *fitting* dei dati e l'interpolazione (*appendice D*) sono stati realizzati con *MatLab 7.0.1 (Statistics Toolbox, MatLab 7.0.1, The MathWorks, Inc. Massachusetts)*.

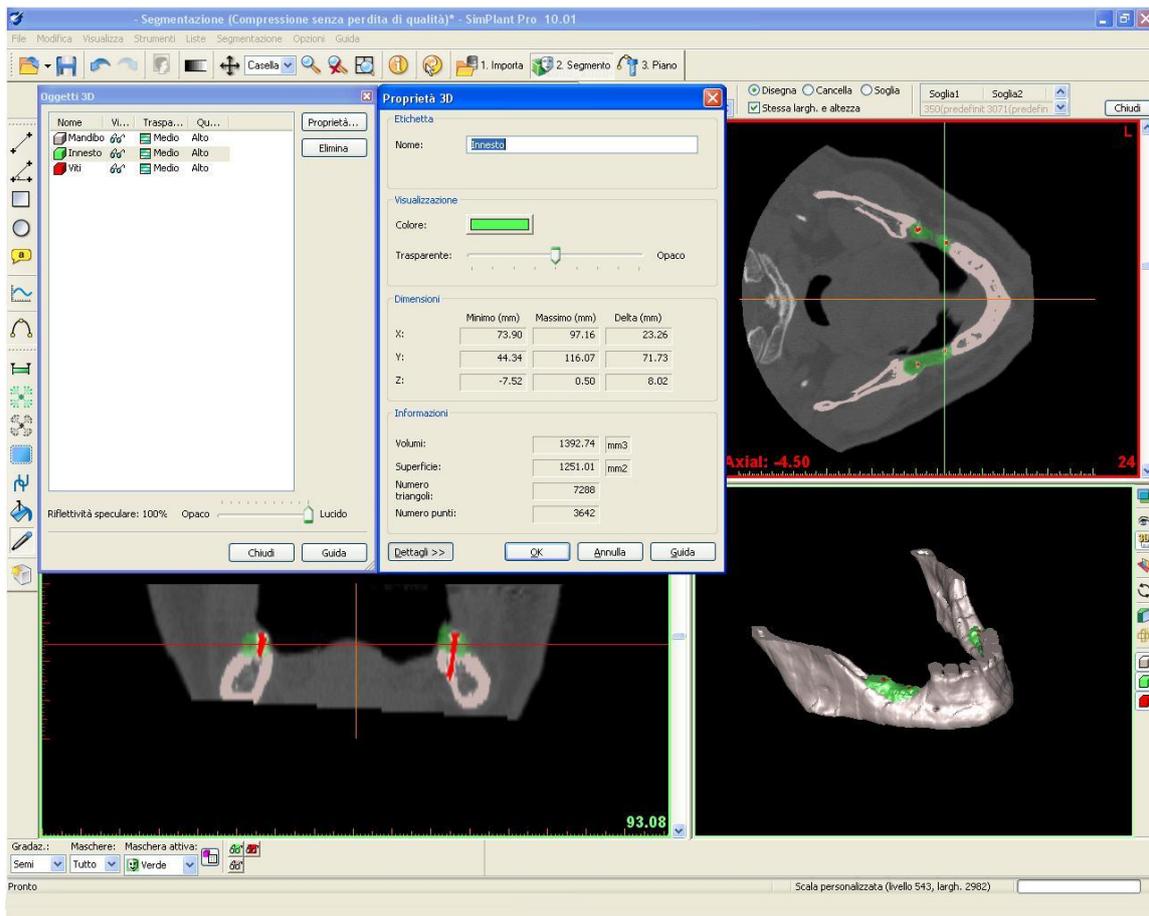


Figura 5. Calcolo del volume e della superficie dell'innesto osseo al T1 mediante la creazione di una maschera di voxel ad intensità ≥ 200 Hu.

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche dei dati sono state realizzate con *MATLAB 7.0.1 (Statistics Toolbox, MatLab 7.0.1, The MathWorks Inc. Massachusetts)*.

Per la costruzione della matrice di correlazione, tra tutte le grandezze misurate e derivate, è stato applicato il metodo di *Spearman*; in tale matrice sono compresi sia i coefficienti di correlazione (ρ) sia i valori di significatività (Sig.) relative a tali coefficienti (con un livello di significatività $\alpha = 0.05$).

I valori delle variabili nelle tabelle e nel testo sono stati rappresentati come media e deviazione standard, $\bar{m} (\pm std)$.

Materiali e metodi Fase Analisi Genica

Geni coinvolti nei processi di incremento e di rimodellamento osseo

È stato ottenuto un iniziale set di geni coinvolti nei processi di incremento e di rimodellamento osseo per mezzo di:

- Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery), motore di ricerca che ha permesso l'accesso a vari *database* integrati, quali PubMed, Genbank, KEGG, OMIM e Genatlas, in grado di fornire riferimenti bibliografici e dati sperimentali³;
- liste di geni ricavate dai DNA-*microarrays* disponibili in commercio.

È stata, quindi, eseguita una ricerca sistematica e ripetitiva, consistente in cicli sequenziali di espansione e filtrazione dei dati:

- l'espansione dei geni è stata ottenuta mediante l'utilizzo del *software* STRING (versione 8.0);
- la filtrazione dei nuovi geni, ottenuti col processo di espansione, è stata realizzata mediante un'ulteriore ricerca eseguita su PubMed che ha permesso di eliminare i falsi positivi.

I dati ricavati dai processi di espansione e filtrazione venivano considerati convergenti solo quando non si riuscivano ad identificare nuovi geni coinvolti nel processo analizzato: a questo punto il ciclo di ricerca veniva arrestato.

Tutte le ricerche sono state eseguite nei *database* sopramenzionati utilizzando la logica booleana ed i suoi operatori (AND, OR, NOT), ed adoperando parole chiave scelte in base alla letteratura, quali “*osteoiduction, osteoconduction, distraction osteogenesis, guided bone regeneration, revascularized bone grafting*” per la valutazione del processo di incremento osseo¹ e “*bone resorption, osseous remodeling*” per l'analisi del processo di rimodellamento osseo (*Tabella 3*).

Sono stati presi in considerazione solo geni umani. Dei geni trovati, sono stati utilizzati solo il simbolo ed il nome assegnati dalla nomenclatura ufficiale di HUGO (*Human Genome Organization*), in modo da ridurre la possibilità di errore in caso di nomi multipli dovuti a simboli precedenti o a pseudonimi.

Previsione delle possibili interazioni

Dal *software* STRING sono state ricavate le interazioni tra i geni coinvolti nei processi presi in considerazione, caratterizzate da un elevato livello di confidenza (punteggio ≥ 0.9).

La somma dei punteggi delle associazioni previste combinate ha permesso di conferire ad ogni gene una variabile numerica definita *numero pesato di legami* (WNL, *Weighted Number of Links*).

Identificazione dei geni leader

La variabile WNL è stata impiegata nell'analisi a *cluster*. Si è ricorso all'algoritmo *K-mean* per raggruppare i geni, che erano suddivisi in gruppi mutualmente esclusivi.

È stato impiegato un algoritmo gerarchico per valutare i raggruppamenti nei dati simultaneamente, tramite la realizzazione di un albero di *cluster*. L'adeguato numero di *cluster* è stato ottenuto tagliando l'albero ad un livello individuato dall'operatore e, pertanto, privo di un criterio standardizzato o di un algoritmo *a priori*.

Per valutare il numero ottimale dei *cluster* K nel complesso dei dati, si è ricorso al metodo del *gap statistico*, eseguendo un confronto tra la dispersione all'interno del *cluster* e quella attesa in un'appropriata distribuzione di riferimento dei dati. La distribuzione di riferimento è stata generata estraendo *m* campioni (laddove *m*=numero dei geni) da una distribuzione uniforme per dimensione di dati, ripetuta B volte (con B=5).

È stato, quindi, eseguito il test di *Kruskal-Wallis* per verificare il numero di *cluster* ottenuti mediante il metodo del *gap statistico*, confrontando le differenze tra i gruppi *cluster* con un livello di significatività statistica di $\alpha = 0.01$.

Si è dato per assunto che i geni con il più alto WNL, che hanno fornito un unico cluster, giocano un ruolo predominante in ciascuno dei processi analizzati e, pertanto, sono stati definiti *geni leader*.

Gli altri geni sono stati suddivisi, in base alla loro importanza, in classi definite con lettere progressive B, C, D etc.

I geni, invece, per i quali non sono state individuate associazioni predittive (WNL = 0), sono stati definiti *geni orfani*.

È stato calcolato il numero di citazioni (*gsc*, *gene score citation*) per ogni gene coinvolto nei due processi analizzati ed è stato definito: gsc^a , nel caso dell'incremento osseo e gsc^r , nel caso del rimodellamento osseo. La ricerca è stata eseguita su PubMed, ricorrendo alla logica booleana che si serve di parole chiave pertinenti, introdotte in tutte le combinazioni (*Tabella 3*). Mediante strategie sequenziali di punteggio come l'*approccio lineare pesato (linear weighted approach)*, è stato dato un punteggio ad ogni gene: tenendo conto degli articoli pubblicati nel *Journal Citation Reports (JCR)*³⁷, senza limitazioni legate al valore di *impact-factor*, la prima referenza dava un punteggio *gsc* pari ad 1 mentre le citazioni multiple successive alla prima incrementavano il valore di 0.5. Non è stata applicata nessuna discriminazione tra i dati ottenuti da studi *in vitro* o *in vivo*.

Database	Contenuti Del Database	Geni Risultanti (n)	Operatori Booleani e Parole Chiave
GenBank	Raccolta di sequenze nucleotidiche disponibili pubblicamente, incluse sequenze di mRNA con regioni di codifica, segmenti di DNA genomico con un singolo gene o geni multipli, e cluster di geni a RNA ribosomiale	Volume augmentation	21
		Bone remodeling	43
OMIM	Raccolta autorevole e globale di geni umani e fenotipi genetici	Volume augmentation	24
		Bone remodeling	31
Genatlas	Contiene informazione rilevanti riguardo la mappatura genica e le patologie genetiche	Volume augmentation	89
		Bone remodeling	60
PubMed	Accesso a tutte le pubblicazioni del database MEDLINE e di giornali addizionali di scienze naturali	Volume augmentation	20
		Bone remodeling	75
Kegg	Database di sistemi biologici, contenente sequenze costituenti geni e proteine (KEGG GENES)	Volume augmentation	57
		Bone remodeling	87
SA BioSciences	DNA-microarray disponibili in commercio	Volume augmentation	32
		Bone remodeling	84

Tabella 3: Database e operatori di logica booleana utilizzati per l'identificazione di geni umani coinvolti nei processi di incremento e di rimodellamento osseo: i numeri risultanti dalla ricerca dei geni sono distribuiti in base ai database utilizzati.

Risultati Fase Chirurgico-Radiologica

Sono stati trattati complessivamente 18 siti edentuli, di cui 6 seni mascellari, 6 regioni frontali mascellari e 6 settori mandibolari posteriori, in 14 pazienti (7 femmine e 7 maschi, di età variabile dai 32 ai 62 anni).

I tre pazienti sottoposti a rialzo bilaterale del seno mascellare erano parzialmente edentuli. Di questi, una paziente si presentava totalmente edentula nell'arcata mandibolare ed è stata sottoposta anche ad innesto ad *onlay* mandibolare.

I sei pazienti sottoposti ad innesto ad *onlay* nella regione frontale mascellare risultavano parzialmente edentuli.

Dei sei pazienti sottoposti a ricostruzione dell'arcata mandibolare, tre pazienti erano completamente edentuli, i rimanenti pazienti erano parzialmente edentuli (*Tabella 4*).

Complessivamente, i pazienti fumatori ammontavano a 2 sui 14 pazienti totali. Nessuno dei pazienti presi in esame presentava patologie sistemiche o controindicazioni alla chirurgia. Prerequisiti indispensabili per poter accedere alla fase chirurgica erano la presenza di una corretta igiene orale e l'assente o moderato consumo di sigarette.

Nell'intervallo di tempo tra l'intervento di chirurgia ricostruttiva e quello di chirurgia implantare è stato chiesto ai pazienti di non esercitare nessun carico protesico sulle zone ricostruite.

	Numero innesti
Onlay mascellare	6
Onlay mandibolare	6
Sinus lift	6

Tabella 4. Suddivisione degli innesti a blocchetto prelevati da cresta iliaca in base al sito ricevente.

Sono state eseguite 6 procedure di grande rialzo del seno mascellare innestando osso autologo in blocchetto, prelevato dalla cresta iliaca: tutti i seni riabilitati sono guariti senza complicanze ed il decorso clinico post-operatorio nei siti di prelievo è stato privo di incidenti.

Sono state eseguite 6 procedure di innesto *ad onlay* nella regione frontale del mascellare superiore e 6 procedure di innesto *ad onlay* a livello della mandibola posteriore, con innesti a blocchetto prelevati da cresta iliaca: tutti gli innesti sono guariti senza complicanze e durante il follow-up non si è verificata nessuna esposizione parziale o totale dell'innesto.

Nelle aree ricostruite sono stati posizionati un totale di 40 impianti dentari. Tutti i pazienti sono stati riabilitati tramite una protesi fissa con ponti e corone in metallo-ceramica, cementati tramite abutment metallici realizzati in laboratorio o tramite abutment tipo UCLA.

La sopravvivenza implantare è stata registrata ad un anno dal posizionamento degli impianti ed ha mostrato un tasso del 100%, in linea con gli attuali dati della letteratura.

Sinus Lift

Al tempo T_1 gli innesti ossei avevano un volume medio pari a $2,06 (\pm 0,86)$ cm^3 , mentre al tempo T_2 questo valore era pari a $1,49 (\pm 0,48)$ cm^3 (Tabella 5). Tuttavia i risultati non hanno mostrato alcuna differenza statisticamente significativa.

Nella Tabella 5 sono riportati anche la superficie di contatto media, il volume medio dell'osso basale, la superficie media degli innesti che sporge nel seno mascellare e la significatività statistica di V_{T_1} vs V_{T_2} valutata col test di Wilcoxon.

Variabili	V_{T_1} (cm^3)	V_{T_2} (cm^3)	$R\%$	CS_{T_1} (cm^2)	BB_{T_1} (cm^3)	SS_{T_1} (cm^2)	pWilcoxon V_{T_1} vs V_{T_2}
Sinus Lift	2,06 ($\pm 0,86$)	1,49 ($\pm 0,48$)	83 (± 29)	7,48 ($\pm 4,61$)	2,58 ($\pm 1,14$)	4,47 ($\pm 1,41$)	0,067

Tabella 5. Sinus Lift. Volume medio (V) misurato al tempo T_1 e al tempo T_2 ; superficie media di contatto (CS), volume medio dell'osso basale (BB) e superficie superiore media degli innesti (SS) misurati al tempo T_1 ; valore medio ricavato di $R\%$.

L'analisi dei coefficienti di correlazione (Tabella 6) ha rivelato l'esistenza di una correlazione negativa statisticamente significativa tra $R\%$ e le variabili CS_{T_1} e BB_{T_1} mentre tutte le altre variabili hanno mostrato una bassa correlazione con $R\%$.

Vista la correlazione riscontrata tra $R\%$ e le variabili CS_{T_1} e BB_{T_1} , i dati degli innesti sono stati analizzati con lo *scatter plot* (*fitting* lineare) e con una procedura di interpolazione 3-D.

Sebbene gli *scatter plot* di $R\%$ in funzione di CS_{T_1} e di BB_{T_1} (Figure 6 e 7) sembrassero lineari, i valori di R^2 ottenuti tramite *fitting* hanno rivelato che i punti non seguono leggi rettilinee.

	R%	CS_{T₁}	SS_{T₁}	BB_{T₁}	indexV_{T₁}	indexH_{T₁}	indexS_{T₁}
R%							
<i>ρ c. coefficient</i>	1	-0,9429	0,5429	-0,8714	0,0857	-0,1429	-0,0286
<i>Sig. (two-tailed)</i>		0,0167	0,2972	0,0428	0,9194	0,8028	1
<i>N</i>	6	6	6	6	6	6	6
CS_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	-0,9429	1	-0,6	0,7143	-0,2571	0,0857	0,0857
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,0167		0,2417	0,1361	0,6583	0,9194	0,9194
<i>N</i>	6	6	6	6	6	6	6
SS_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	0,5429	-0,6	1	0,0857	0,3143	0,4286	-0,1429
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,2972	0,2417		0,9194	0,5639	0,4194	0,8028
<i>N</i>	6	6	6	6	6	6	6
BB_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	-0,8714	0,7143	0,0857	1	0,1429	0,3714	0,0857
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,0428	0,1361	0,9194		0,8028	0,4972	0,9194
<i>N</i>	6	6	6	6	6	6	6
indexV_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	0,0857	-0,2571	0,3143	0,1429	1	-0,3714	0,4286
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,9194	0,6583	0,5639	0,8028		0,4972	0,4194
<i>N</i>	6	6	6	6	6	6	6
indexH_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	-0,1429	0,0857	0,4286	0,3741	-0,3714	1	-0,8286
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,8028	0,9194	0,4194	0,4972	0,4972		0,0583
<i>N</i>	6	6	6	6	6	6	6
indexS_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	-0,0286	0,0857	-0,1429	0,0857	0,4286	-0,8286	1
<i>Sig. (two-tailed)</i>	1	0,9194	0,8028	0,9194	0,4194	0,0583	
<i>N</i>	6	6	6	6	6	6	6

Tabella 6. Sinus lift. Coefficienti ρ di Spearman tra tutte le variabili misurate e derivate (R%, CS_{T₁}, SS_{T₁}, BB_{T₁}, indexV_{T₁}, indexH_{T₁} e indexS_{T₁}) con un livello di significatività (evidenziato in rosso) settato al 5%.

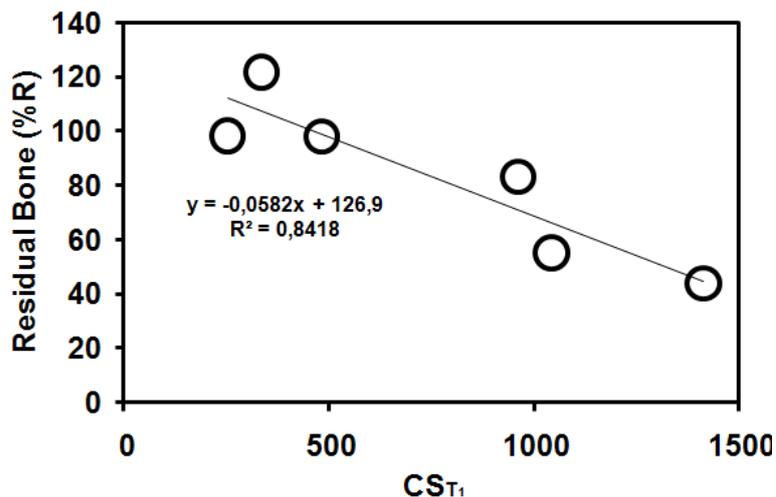


Figura 6. Sinus lift. Plot della percentuale dell'innesto residuo al T_2 in funzione della superficie di contatto dell'innesto col sito ricevente (CS_{T1}); il valore di R^2 ottenuto dal fitting lineare è pari a 0,8418.

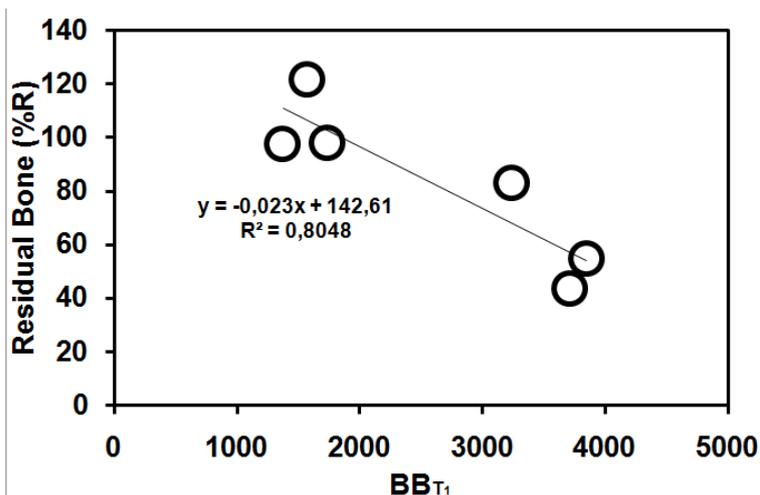


Figura 7. Sinus lift. Plot della percentuale dell'innesto residuo al T_2 in funzione del Volume dell'Osso Basale (BB_{T1}); il valore di R^2 ottenuto dal fitting lineare è pari a 0,8048.

A questo punto è stata eseguita una procedura di interpolazione 3-D della percentuale di innesto residuo al tempo T_2 in funzione di CS_{T1} e BB_{T1} (Figura 8), la quale ha mostrato che il volume del riassorbimento trascurabile ($R\% \geq 100$) era delimitato da CS_{T1} variabile da 0 a 500 mm², da BB_{T1} variabile da 0 a 3100 mm³.

I dati relativi all'interpolazione sono stati utilizzati per la costruzione di un grafico tridimensionale che si basa sulla tessellazione di *Delaunay* in cui

ciascun innesto osseo viene rappresentato da un punto colorato; la disposizione planare di tale punto è garantita dai due indici utilizzati come coordinate [x e y], mentre il colore rappresenta la percentuale di innesto residuo al tempo T_2 (rosso = innesto conservato, blu = innesto riassorbito).

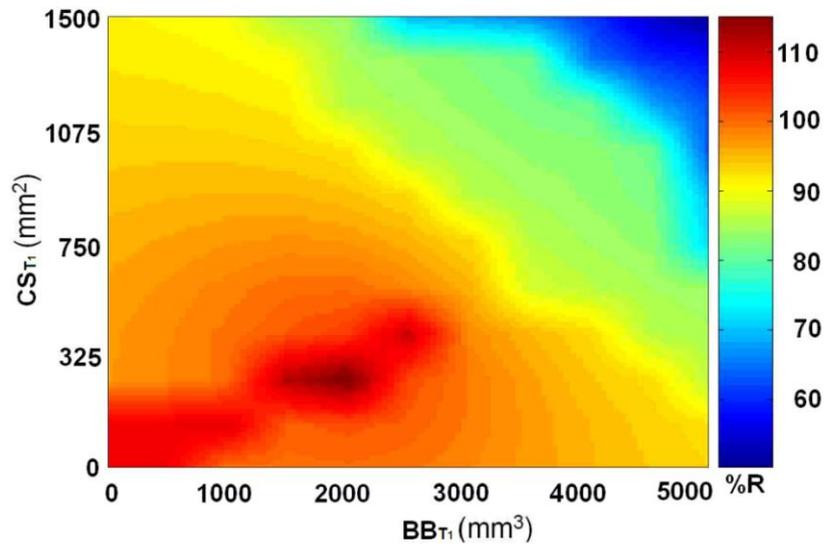


Figura 8. Interpolazione 3-D dei dati al variare della Superficie di Contatto (CS_{T_1}) e del Volume dell'Osso Basale (BB_{T_1}). La barra dei colori indica il valore di R%.

Innesti ad onlay mascellari

Al tempo T_1 gli innesti ossei avevano un volume medio pari a $1,95 (\pm 2,04)$ cm^3 , mentre al tempo T_2 questo valore era pari a $1,59 (\pm 2,17)$ cm^3 . Tuttavia i risultati non hanno mostrato differenze statisticamente significative.

Nella *Tabella 7* sono riportati anche la superficie di contatto media, il volume medio dell'osso basale, la superficie media degli innesti in contatto col tessuto periostale e la significatività statistica di V_{T_1} vs V_{T_2} valutata col test di *Wilcoxon*.

<i>Variabili</i>	V_{T_1} (cm^3)	V_{T_2} (cm^3)	R%	CS_{T_1} (cm^2)	BB_{T_1} (cm^3)	SS_{T_1} (cm^2)	pWilcoxon V_{T_1} vs V_{T_2}
<i>Onlay mascellari con blocchetti di cresta iliaca</i>	1,95 ($\pm 2,04$)	1,59 ($\pm 2,17$)	64 (± 28)	4,23 ($\pm 3,03$)	2,76 ($\pm 1,22$)	3,22 ($\pm 0,68$)	0.082

Tabella 7. Onlay mascellari. Volume medio (V) misurato al tempo T_1 e al tempo T_2 ; superficie media di contatto (CS), volume medio dell'osso basale (BB) e superficie superiore media degli innesti (SS) misurati al tempo T_1 ; valore medio ricavato di R%.

L'analisi dei coefficienti di correlazione (*Tabella 8*) ha rivelato l'esistenza di una correlazione negativa statisticamente significativa tra R% e le variabili $\text{index}V_{T_1}$ e $\text{index}H_{T_1}$ mentre tutte le altre variabili hanno mostrato una bassa correlazione con R%.

Vista la correlazione riscontrata tra R% e le variabili $\text{index}V_{T_1}$ e $\text{index}H_{T_1}$, i dati degli innesti sono stati analizzati con lo *scatter plot* (*fitting* lineare) e con una procedura di interpolazione 3-D.

Sebbene gli *scatter plot* di R% in funzione di $\text{index}V_{T_1}$ e $\text{index}H_{T_1}$ (*Figure 9 e 10*) sembrassero lineari, i valori di R^2 ottenuti tramite *fitting* hanno rivelato che i punti non seguono leggi rettilinee.

	R%	CS _{T₁}	SS _{T₁}	BB _{T₁}	indexV _{T₁}	indexH _{T₁}	indexS _{T₁}
R%							
<i>ρ c. coefficient</i>	1	0,0857	0,4857	-0,0857	-0,7286	0,866	-0,3143
<i>Sig. (two-tailed)</i>		0,9194	0,3556	0,9194	0,042	0,024	0,5639
N	6	6	6	6	6	6	6
CS_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	0,0857	1	0,7143	0,6	-0,3714	0,2	0,7143
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,9194		0,1361	0,2417	0,4972	0,7139	0,1361
N	6	6	6	6	6	6	6
SS_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	0,4857	0,7143	1	0,0857	-0,8857	0,7714	0,6571
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,3556	0,1361		0,9194	0,0333	0,1028	0,1750
N	6	6	6	6	6	6	6
BB_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	-0,0857	0,6	0,0857	1	0,3714	-0,5429	0,0857
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,9194	0,2417	0,9194		0,4972	0,2972	0,9194
N	6	6	6	6	6	6	6
indexV_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	-0,7286	-0,3714	0,8857	0,3714	1	-0,9424	-0,6
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,042	0,4972	0,0333	0,4972		0,0167	0,2417
N	6	6	6	6	6	6	6
indexH_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	0,866	0,2	0,7714	-0,5429	-0,9429	1	0,3714
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,024	0,7139	0,1028	0,2972	0,0167		0,4972
N	6	6	6	6	6	6	6
indexS_{T₁}							
<i>ρ c. coefficient</i>	-0,3143	0,7143	0,6571	0,0857	-0,6	0,3714	1
<i>Sig. (two-tailed)</i>	0,5639	0,1361	0,175	0,9194	0,2417	0,4972	
N	6	6	6	6	6	6	6

Tabella 8. Onlay mascellari. Coefficienti ρ di Spearman tra tutte le variabili misurate e derivate (R%, CS_{T₁}, SS_{T₁}, BB_{T₁}, indexV_{T₁}, indexH_{T₁} e indexS_{T₁}) con un livello di significatività (evidenziato in rosso) settato al 5%.

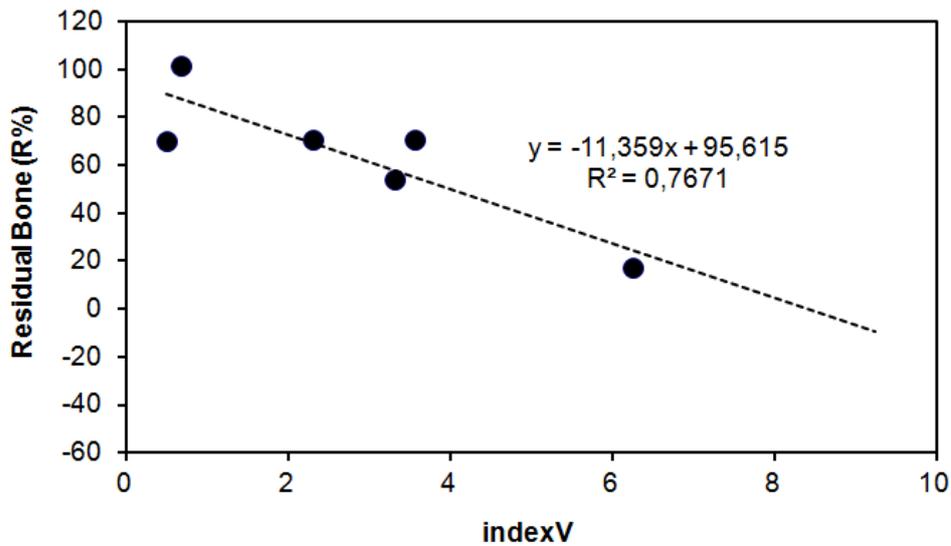


Figura 9. Onlay mascellari. Plot della percentuale dell'innesto residuo al T_2 in funzione dell'Indice di Volume al tempo T_1 ($indexV_{T1}$); il valore di R^2 ottenuto dal fitting lineare è pari a 0,7671.

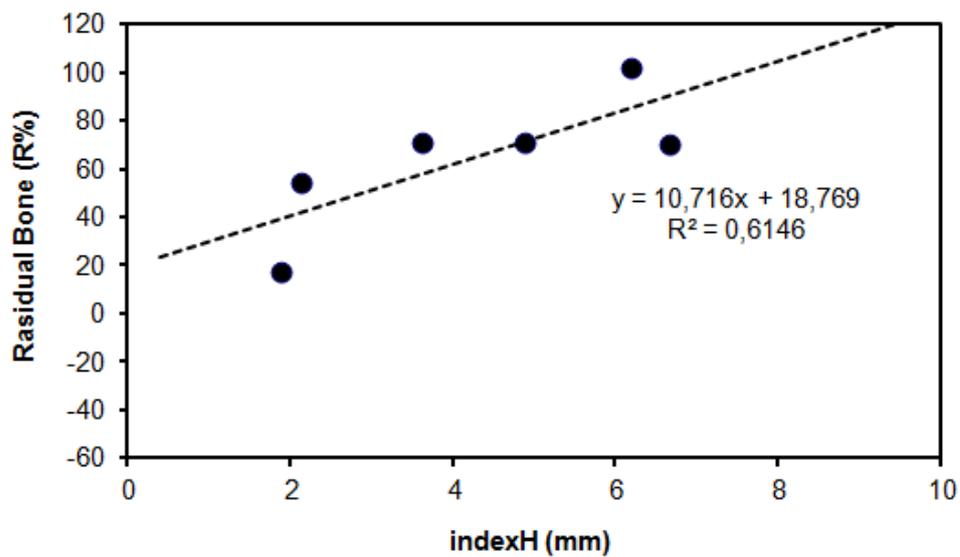


Figura 10. Onlay mascellari. Plot della percentuale dell'innesto residuo al T_2 in funzione dell'Indice di Altezza ($indexH_{T1}$); il valore di R^2 ottenuto dal fitting lineare è pari a 0,6146.

A questo punto è stata eseguita una procedura di interpolazione 3-D della percentuale di innesto residuo al tempo T_2 in funzione di $\text{index}V_{T_1}$ e $\text{index}H_{T_1}$ (Figura 11), la quale ha mostrato che il volume del riassorbimento trascurabile ($R\% \geq 100$) era delimitato da $\text{index}V_{T_1}$ variabile da 0 a 5000 mm^3 , da $\text{index}H_{T_1}$ variabile da 4,00 a 6,67 mm.

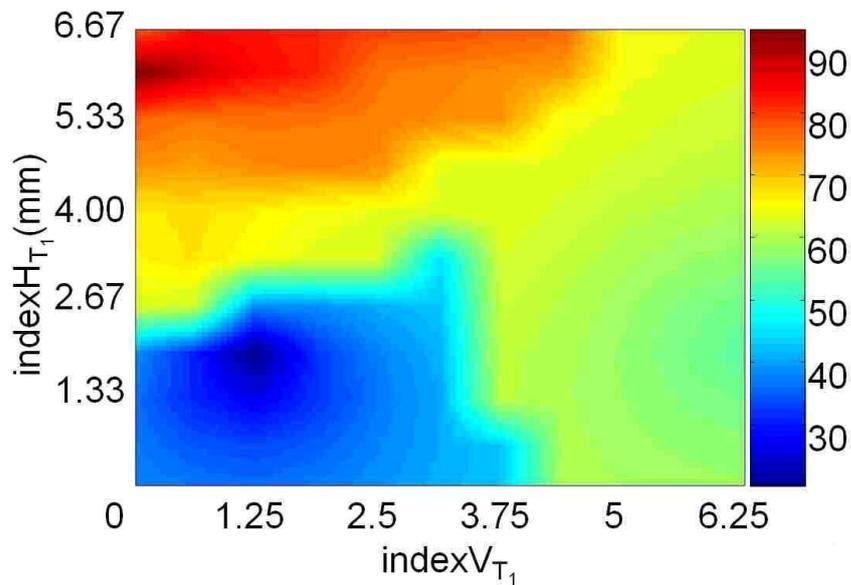


Figura 11. Interpolazione 3-D dei dati al variare dell'Indice di Altezza ($\text{index}H_{T_1}$) e dell'Indice di Volume ($\text{index}V_{T_1}$). La barra dei colori indica il valore di $R\%$.

Innesti ad onlay mandibolari

I valori dei volumi medi (al T₁ e al T₂), la media delle percentuali di innesto residuo (R%), insieme con la Superficie di Contatto media, l'Osso Basale medio, la Superficie Esterna media e le comparazioni tra V_{T₁} e V_{T₂} sono riportati in *Tabella 9*.

Variabili	V_{T₁} (cm³)	V_{T₂} (cm³)	R%	CS_{T₁} (cm²)	BB_{T₁} (cm³)	SS_{T₁} (cm²)	pWilcoxon V_{T₁} vs V_{T₂}
<i>Onlay mandibolari con blocchetti di cresta iliaca</i>	1,24 (±0,56)	0,42 (±0,72)	23 (±48)	3,33 (±1,46)	5,32 (±1,32)	4,9 (±3,36)	0.032*

Tabella 9. Onlay mandibolari. Valori medi di V_{T₁} e di V_{T₂}, media delle percentuali di innesto residuo (R%), Superficie di Contatto media, l'Osso Basale medio, la Superficie Esterna media e le comparazioni tra V_{T₁} e V_{T₂} (statistica significativa).*

È possibile osservare che l'innesto osseo al tempo T₁ aveva un volume medio pari a 1,24 (±0,56) cm³, mentre a distanza di 1 anno il volume si è ridotto a 0,42 (±0,72) cm³ con un riassorbimento medio del 77%. Le comparazioni tra T₁ e T₂ hanno mostrato differenze statisticamente significative per innesti prelevati dalla cresta iliaca e posizionati nella mandibola posteriore.

È stata cercata una correlazione tra il rimodellamento osseo e le caratteristiche tridimensionali dell'innesto dopo l'inserimento implantare; le analisi di correlazione hanno mostrato che il rimodellamento di innesti prelevati da cresta iliaca e posizionati a livello mandibolare è influenzato dalla forma dell'innesto (IndexS_{T₁}) e dal volume dell'osso basale (BB_{T₁}). Nessun'altra caratteristica 3-D è sembrata coinvolta (*Tabella 10*).

	R%	CS _{T₁}	SS _{T₁}	BB _{T₁}	indexV _{T₁}	indexH _{T₁}	indexS _{T₁}
R%							
<i>ρ</i> c. coefficient	1	0,6571	0,8286	0,9429	-0,0286	0,3143	-0,8429
Sig. (two-tailed)		0,175	0,0583	0,0167	1	0,5639	0,0429
N	6	6	6	6	6	6	6
CS_{T₁}							
<i>ρ</i> c. coefficient	0,6571	1	0,6571	0,7714	-0,0286	-0,0286	0,0857
Sig. (two-tailed)	0,175		0,175	0,1028	1	1	0,9194
N	6	6	6	6	6	6	6
SS_{T₁}							
<i>ρ</i> c. coefficient	0,8286	0,6571	1	0,7714	-0,3714	0,6571	-0,0857
Sig. (two-tailed)	0,0583	0,175		0,1028	0,4972	0,175	0,9194
N	6	6	6	6	6	6	6
BB_{T₁}							
<i>ρ</i> c. coefficient	0,9429	0,7714	0,7714	1	0,0857	0,2571	-0,4857
Sig. (two-tailed)	0,0167	0,1028	0,1028		0,9194	0,6583	0,3556
N	6	6	6	6	6	6	6
indexV_{T₁}							
<i>ρ</i> c. coefficient	-0,0286	-0,0286	-0,3741	0,0857	1	-0,5429	0,5429
Sig. (two-tailed)	1	1	0,4972	0,9194		0,2972	0,2972
N	6	6	6	6	6	6	6
indexH_{T₁}							
<i>ρ</i> c. coefficient	0,3143	-0,0286	0,6571	0,2571	-0,5429	1	0,0286
Sig. (two-tailed)	0,5639	1	0,175	0,6583	0,2972		1
N	6	6	6	6	6	6	6
indexS_{T₁}							
<i>ρ</i> c. coefficient	-0,8429	0,0857	-0,0857	-0,4857	-0,5429	0,0286	1
Sig. (two-tailed)	0,0429	0,9194	0,9194	0,3556	0,2972	1	
N	6	6	6	6	6	6	6

Tabella 10. Onlay mandibolari. Coefficienti ρ di Spearman tra tutte le variabili misurate e derivate (R%, CS_{T₁}, SS_{T₁}, BB_{T₁}, indexV_{T₁}, indexH_{T₁} e indexS_{T₁}) con un livello di significatività (evidenziato in rosso) settato al 5%.

Il *fitting* lineare ha mostrato che i dati non si adattano ad una funzione rettilinea, come suggerito dai valori di R^2 (Figure 12 e 13). L'interpolazione tridimensionale di R% in funzione della coppia BB_{T_1} - $IndexS_{T_1}$ ha mostrato che l'area di minor riassorbimento ($R\% > 80$) era delimitata per innesti verticali della mandibola posteriore da un set di dati con BB_{T_1} variabile da 0 a 6,8 cc e $IndexS_{T_1}$ variabile da 0 a 0,78 mm (Figura 14).

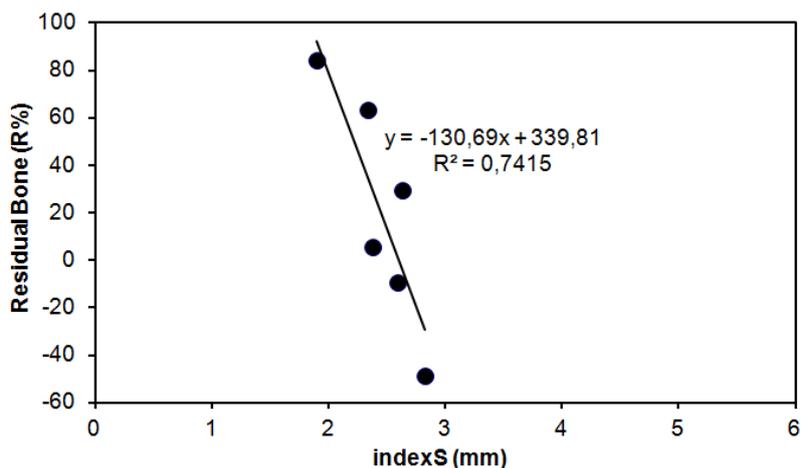


Figura 12. Onlay mandibolare. Plot della percentuale dell'innesto residuo al T_2 in funzione dell'indice relativo alla forma dell'innesto osseo ($indexS_{T_2}$) il valore di R^2 ottenuto dal fitting lineare è pari a 0,7415.

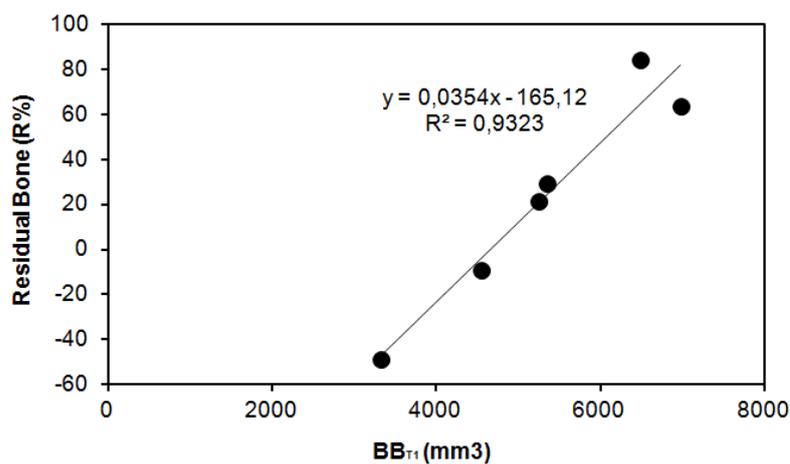


Figura 13. Onlay mandibolare. Plot della percentuale dell'innesto residuo al T_2 in funzione dell'indice relativo al volume di osso basale (BB_{T_2}), il valore di R^2 ottenuto dal fitting lineare è pari 0.9323.

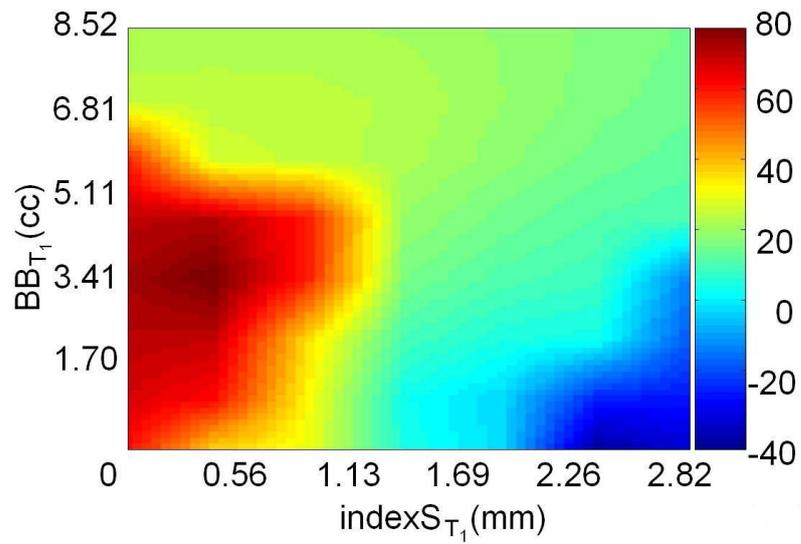


Figura 14. Interpolazione 3-D dei dati al variare dell'osso basale (BB_{T1}) e dell'indice di Forma ($indexS_{T1}$). La barra dei colori indica il valore di R%.

Risultati Fase Analisi Genica

La prima ricerca nei database, basata sulle parole chiave, ha portato all'individuazione di 114 e 99 geni potenzialmente coinvolti rispettivamente nei processi di incremento e di rimodellamento osseo.

La *Tabella 11* mostra il tipo di ricerca eseguita nei vari database: è importante tener presente che database diversi possono identificare lo stesso gene.

Il complesso esteso dei dati, al momento della convergenza (dopo tre cicli di espansione e filtraggio) comprendeva 161 geni potenzialmente coinvolti nel processo di incremento osseo e 128 geni potenzialmente legati al fenomeno del rimodellamento osseo.

La mappa delle interazioni di STRING è rappresentata nelle *Figure 15 e 16*.

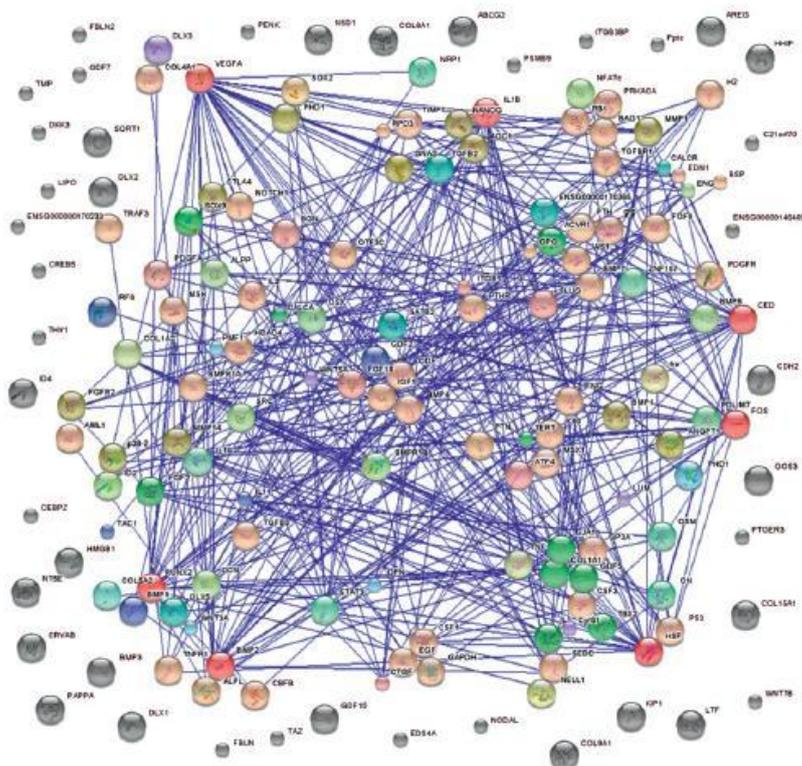


Figura 15: Mappa Finale di tutti i geni coinvolti nel processo di incremento osseo, in accordo con STRING. I geni leader e i geni appartenenti al cluster B appaiono rossi, i geni orfani grigi. Le linee che connettono i singoli geni rappresentano le associazioni funzionali previste tra le proteine.

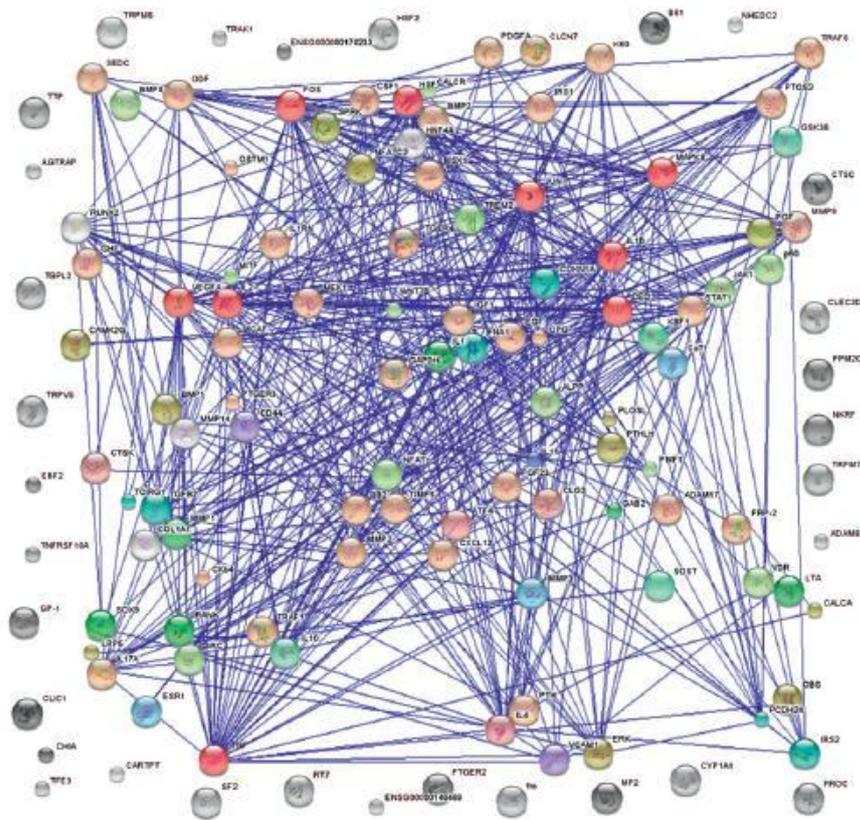


Figura 16: Mappa Finale di tutti i geni coinvolti nel processo di rimodellamento osseo, in accordo con STRING. I geni leader e i geni appartenenti al cluster B appaiono rossi, i geni orfani grigi. Le linee che connettono i singoli geni rappresentano le associazioni funzionali previste tra le proteine.

All'aumentare del numero di *cluster*, l'algoritmo di raggruppamento *K-means* ha fornito un numero stazionario di geni appartenenti al gruppo dei geni *leader*, per entrambi i processi analizzati (Figure 17 e 18).

Il metodo del *gap statistic* ha permesso di stimare il numero dei *cluster* *K*, pari a 11 nel processo d'incremento osseo e pari a 7 nel fenomeno di rimodellamento osseo (Figure 19 e 20). Escludendo il *cluster* dei geni *leader* e quello dei geni *orfani*, gli altri *cluster* sono stati definiti con lettere progressive B, C, etc. fino alla lettera J, nel processo di incremento osseo, e, fino alla lettera F, nel processo di rimodellamento osseo.

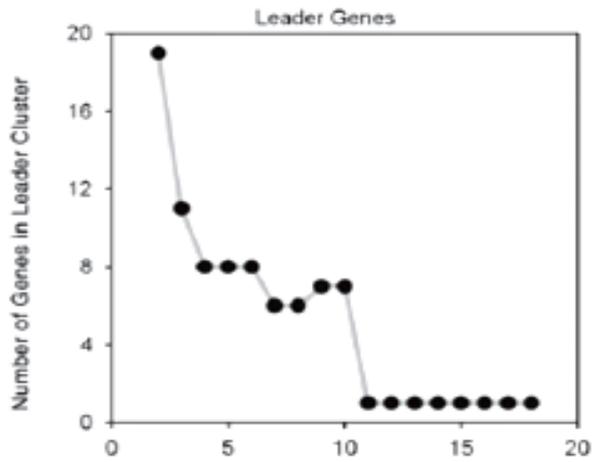


Figura 17: Geni appartenenti al cluster leader in diversi esperimenti con l'algoritmo K-mean con un crescente numero di cluster, nel processo di incremento osseo.

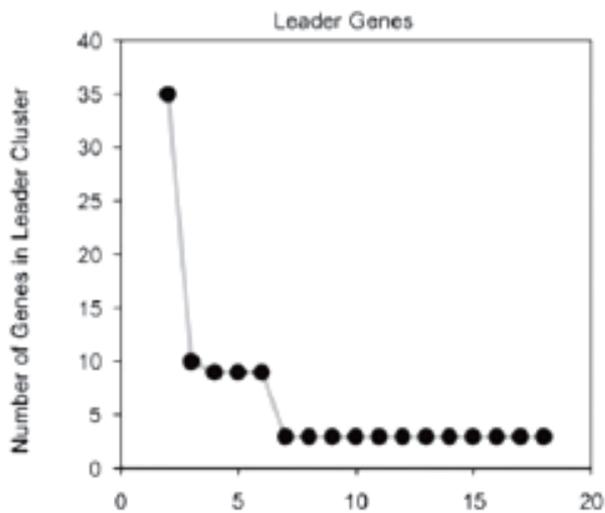


Figura 18: Geni appartenenti al cluster leader in diversi esperimenti con l'algoritmo K-mean con un crescente numero di cluster, nel processo di rimodellamento osseo.

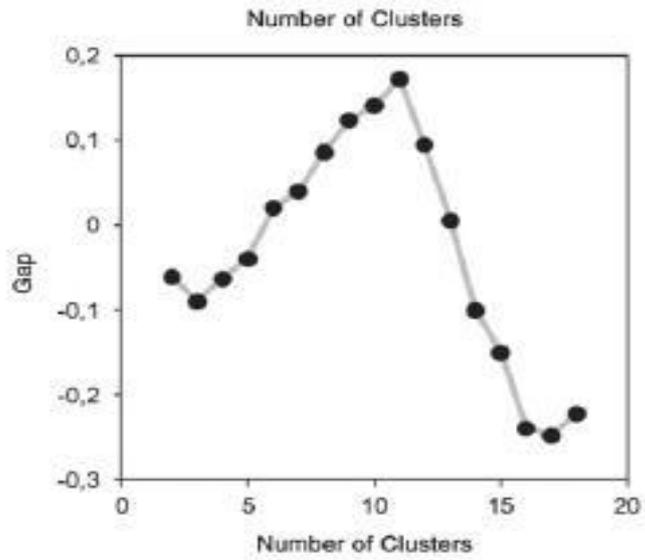


Figura 19: Plot del metodo del gap statistico per individuare il numero di cluster K , nel processo di incremento osseo.

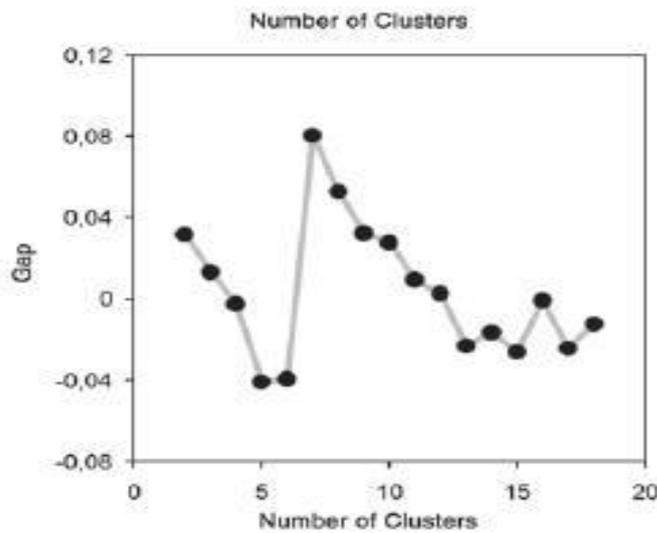


Figura 20: Plot del metodo del gap statistico per individuare il numero di cluster K , nel processo di riassorbimento osseo.

È stato individuato solo un gene appartenente al *cluster* dei geni *leader* nel processo di incremento osseo, mentre nel processo di rimodellamento osseo ne sono stati individuati 3.

Il test di *Kruskal-Wallis* ha ulteriormente confermato i risultati, rilevando differenze statisticamente significative tra i differenti *cluster*, *cluster* dei geni *leader*, *cluster* B, *cluster* C, etc., sia nel fenomeno di incremento che nel fenomeno di rimodellamento osseo.

Processo di incremento osseo

Nel processo di incremento osseo, l'analisi a *cluster* dei dati ha indicato la presenza di un solo gene *leader* (VEGFA) e di 6 geni appartenenti al gruppo B.

42 geni, di cui non sono state rilevate interazioni, sono stati definiti geni orfani.

La valutazione delle citazioni in letteratura, nell'analisi gsc^a dei geni appartenenti al *cluster* dei geni *leader* e al *cluster* B ha rivelato che solo per tre su sette dei geni trovati era noto un legame col processo di incremento osseo. I geni dei cluster superiori caratterizzati da un numero basso di citazioni sono: IL6 (o HSF) ($gsc^a = 11$), RUNX2 ($gsc^a = 9$), FOS ($gsc^a = 4$), IL1B ($gsc^a = 6$).

Processo di rimodellamento osseo

Nel processo di rimodellamento osseo sono stati individuati 3 geni *leader*, JUN, IL6 (o HSF) e TNF- α (o TNF). Sono stati trovati 6 geni appartenenti al *cluster* B e 31 geni orfani.

La ricerca di citazioni riguardanti l'analisi dei geni appartenenti al *cluster* dei geni *leader* e al *cluster* B ha rivelato che solamente il ruolo di TNF- α era già conosciuto nel processo di rimodellamento dei tessuti duri.

I geni caratterizzati da valori di gsc^r relativamente bassi erano IL2 ($gsc^r = 3$), MAPK8 ($gsc^r = 0$), TGFB1 (o CED) ($gsc^r = 11$) e IL1B ($gsc^r = 8$), tutti appartenenti al *cluster* B.

La *Tabella 11* mostra i punteggi specifici sia per i geni *leader* che per i geni del *cluster* B per entrambi i gruppi: nel gruppo incremento osseo, i

punteggi medi specifici sono pari a 25.7% per i geni del cluster B; nel gruppo del rimodellamento osseo i punteggi medi specifici sono rispettivamente pari a 19.7% per il *cluster* dei geni *leader* e 18% per il *cluster* B.

La *Tabella 12* mostra i 4 geni con i valori più alti di gsc per entrambi i gruppi, specificando la classe di appartenenza.

Nome gene	Nome ufficiale	gsc (n)	Interazioni nel fenomeno analizzato (n)	Interazioni in STRING (n)	Punteggi o specifici (%)
Incremento osseo					
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A precursor	50	35	171	20.4
IL 6 (o HSF)	Interleukin-6 precursor	11	22	123	17.9
BMP2	Bone morphogenetic protein 2 precursor	356.5	25	70	35.7
TGFB1 (o CED)	Trasforming growth factor beta-1 precursor	33	23	133	17.3
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	9	25	51	49
FOS	Proto-oncogene protein c-fos	4	27	184	14.7
IL 1β	Interleukin-1 beta precursor	6	24	124	19.4
Rimodellamento osseo					
TNF-α (o TNF)	Tumor necrosis factor precursor	235.5	42	267	15.7
JUN	Transcription factor AP-1 (activator protein 1)	20	35	262	13.4
IL6 (o HSF)	Interleukin-6 precursor	75	37	123	30.1
IL2	Interleukin-2 precursor	3	27	170	15.9
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A precursor	20	28	171	16.4
FOS	Proto-oncogene protein c-fos	49	30	184	16.3
TGFB1 (o CED)	Trasforming growth factor beta-1 precursor	11	26	134	19.4
IL1β	Interleukin-1 beta precursor	8	31	124	25
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	0	29	193	15

Tabella 11: Geni leader e geni del cluster B classificati in base al numero di citazioni in PubMed (gsc), al numero delle interazioni previste e ai punteggi specifici, nei processi di incremento e di riassorbimento osseo.

Nome gene	Nome ufficiale	gsc (n)	Interazioni nel fenomeno analizzato (n)	Classe
<i>Incremento osseo</i>				
BMP2	Bone morphogenetic protein 2 precursor	365.5	25	B
BMP7	Bone morphogenetic protein 7 precursor	85	15	C
PTH	Parathyroid hormone precursor	77	5	G
TNFα- (o TNF)	Tumor necrosis factor precursor	72	4	H
<i>Rimodellamento osseo</i>				
TNFSF11 (o ODF)	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11	239	17	C
TNFα- (o TNF)	Tumor necrosis factor precursor	235	42	GENE LEADER
TNFRSF11B (o OPG)	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B precursor	220	2	F
PTH	Parathyroid hormone precursor	209.5	6	E

Tabella 12: Geni classificati in base al numero di citazioni, nei processi di incremento e di rimodellamento osseo.

Discussioni *Fase Clinico-radiografica*

Scopo di questo studio è stata l'analisi del rimodellamento osseo in relazione alle caratteristiche tridimensionali degli innesti ad *inlay* nelle procedure di grande rialzo del seno mascellare e degli innesti ad *onlay* mascellari e mandibolari.

L'ipotesi iniziale era che le caratteristiche tridimensionali degli innesti ossei e del sito ricevente, e le relazioni tra essi, potessero influenzare il processo di rimodellamento osseo.

L'osso autologo non vascolarizzato è stato ampiamente utilizzato nella ricostruzione delle creste alveolari atrofiche anche se uno dei maggiori problemi di questa tecnica, anche quando considerata riuscita, è rappresentato dal continuo rimodellamento dell'innesto nel tempo. Si è ricorso, pertanto, alle scansioni TC per stimare il volume degli innesti ossei, ottenendo una radiografia di sottrazione.

Johansson & Coll.³⁸, valutando i cambiamenti volumetrici di innesti sia ad *onlay* che ad *inlay* di osso autologo prelevato da cresta iliaca, posizionati nella mascella, hanno registrato, al controllo post-operatorio a 6 mesi (appena prima dell'inserimento implantare), una riduzione media del volume pari al 47% per gli *inlay* e al 50% per gli *onlay*.

Studi radiografici bidimensionali a 5 anni su innesti ad *onlay* in mandibole umane hanno riportato un riassorbimento degli innesti prelevati da cresta iliaca compreso tra il 44 e il 50%³⁹.

Smolka & Coll.³⁵, valutando gli innesti autologhi prelevati dalla calvaria, di derivazione embriologica membranosa e ricchi in osso corticale, hanno evidenziato che la riduzione media del volume è pari al 10.7% a 6 mesi, e al 19.2% a 1 anno di *follow-up*. Gli Autori hanno, pertanto, suggerito un modello di riassorbimento lineare nel tempo per questo tipo di innesto, apparentemente non condizionato dal posizionamento implantare.

Il presente studio evidenzia un riassorbimento medio degli innesti di cresta iliaca in blocchetto pari a:

- 36% negli *onlay* mascellari,
- 17% nelle procedure di Sinus Lift,
- 77% negli *onlay* mandibolari.

Riassorbimento osso autologo nelle procedure di Sinus Lift

Nell'analisi degli innesti ad *inlay* mascellari, la radiodiagnostica per immagini di tipo tridimensionale ha permesso di misurare il volume dell'osso innestato, l'area della superficie superiore che sporge nella cavità sinusale e l'area della superficie di contatto con il sito ricevente³⁰.

Il presente studio ha sottolineato un riarrangiamento variabile dell'osso autologo innestato nei seni mascellari, che mostra una tendenza media di rimodellamento pari al 17%, con una percentuale di osso residuo al T₂ (R%) variabile tra il 54 e il 112%.

Non è stata registrata alcuna differenza statisticamente significativa nel confronto tra i volumi degli innesti a T₁ e T₂ (*Tabella 5*).

Il gruppo preso in esame è risultato numericamente adeguato e uniformemente distribuito per l'analisi di correlazione. I dati che attestavano la significatività nella relazione tra R% e le variabili CS_{T₁} e BB_{T₁} sono stati analizzati con il *fitting* lineare e con una procedura di interpolazione. I risultati dell'interpolazione 3-D hanno mostrato che, nonostante un rimodellamento medio trascurabile, possono essere identificati diversi modelli di riassorbimento. Un innesto sottile, con una superficie superiore piccola in regioni con un volume del pavimento sinusale ridotto, sperimenta, dopo il posizionamento implantare, un rimodellamento ridotto o positivo, mentre un innesto spesso, con una superficie superiore ampia e un volume del pavimento sinusale notevole, mostra invece un riassorbimento elevato.

Riassorbimento osseo negli innesti ad onlay mascellari

È stato evidenziato un riassorbimento medio degli innesti di cresta iliaca posizionati ad *onlay* nel mascellare superiore pari al 36% al T₂.

Alla comparazione tra i valori del volume a T₁ e T₂, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative (*Tabella 7*).

Il gruppo preso in esame è risultato numericamente adeguato e uniformemente distribuito per l'analisi di correlazione. I dati che attestavano la significatività nella relazione tra R% e le variabili IndexV_{T₁} e IndexH_{T₁} sono stati analizzati con il *fitting* lineare e con una procedura di

interpolazione, che hanno indicato come un eventuale *bias* introdotto dalla natura retrospettiva dei dati non incida sulla validità degli stessi.

I risultati dell'interpolazione 3-D hanno mostrato che, nonostante un rimodellamento medio trascurabile, possono essere identificati due opposti modelli di riassorbimento³⁰: un innesto spesso posizionato in una regione mascellare anteriore atrofica che riassorbe, dopo il posizionamento implantare, meno di un innesto più sottile posizionato nella stessa sede, per la contemporanea esistenza di elevati IndexV_{T_1} e IndexH_{T_1} .

Riassorbimento osseo negli innesti ad onlay mandibolari

Innesti prelevati da cresta iliaca e posizionati nella regione posteriore mandibolare come *onlay*, hanno mostrato un riassorbimento medio del 77%. Comparazioni tra V_{T_1} e V_{T_2} hanno evidenziato una marcata riduzione al T_2 , con differenze statisticamente significative (*Tabella 9*). I risultati hanno mostrato che il riassorbimento risulta correlato a due variabili, BB_{T_1} e IndexS_{T_1} .

I dati sono in linea con i risultati degli studi in letteratura^{30,35,38}.

Il gruppo preso in esame è risultato numericamente adeguato e uniformemente distribuito per un'analisi di correlazione. I dati che attestavano la significatività nella relazione tra R% e le variabili IndexS_{T_1} e BB_{T_1} sono stati analizzati, anche in questo caso, mediante un *fitting* lineare e una procedura di interpolazione.

I dati raccolti hanno suggerito che minore è la distanza media tra il centro di gravità dell'innesto e la sua superficie esterna (bassi valori di IndexS_{T_1}) e più è grande il volume di osso basale (alti valori di BB_{T_1}), più limitato risulta il rimodellamento.

Retrospettivamente, innesti da cresta iliaca arrotondati con superficie esterna convessa, posizionati nella mandibola posteriore con un adeguato volume osseo basale, hanno evidenziato un minimo riassorbimento³⁰.

Rimodellamento degli innesti ossei autologhi

I dati ottenuti hanno mostrato che il fenomeno del rimodellamento è troppo complesso per essere analizzato tramite strumenti di analisi statistica semplici.

La procedura di interpolazione 3-D evidenzia, in tutti i casi, come i valori di riassorbimento trascurabile ($R\% \geq 70$) sono limitati ad una sola, piccola zona del volume di interpolazione, completamente separata dalla piccola ed unica regione dei valori di riassorbimento massimo, suggerendo un fenomeno di rimodellamento predicibile attraverso lo studio dell'anatomia tridimensionale del seno rialzato.

È necessario sottolineare, inoltre, che il risultato della presente analisi di interpolazione descrive il modello di riassorbimento degli innesti solo dopo il posizionamento degli impianti e che tale modello non rispecchia necessariamente il rimodellamento prima di questa fase.

Poiché le proprietà dell'innesto osseo oltre alle sue caratteristiche tridimensionali ed alla densità, per esempio la composizione ed il rapporto corticale/midollare, possono interferire con il suo rimodellamento, potrebbe risultare molto utile un'ulteriore analisi multidimensionale della struttura dell'osso allo scopo di arrivare ad una previsione più accurata del riassorbimento. Si ritiene perciò che siano necessari ulteriori studi per confermare i dati attuali.

Discussioni Fase Analisi Genica

Numerosi studi hanno dimostrato che fattori diversi, quali l'ultrastruttura, la morfologia, l'orientamento e l'origine embriologica dell'innesto osseo, influenzano il risultato delle procedure di incremento del volume osseo e, di conseguenza, del processo di rimodellamento^{40,41,42}, che, a sua volta, può essere influenzato anche dalla natura dei materiali da innesto utilizzati^{35,43}.

Poiché, inoltre, molti fattori induttivi durante le procedure ricostruttive sono in grado di stimolare l'incremento locale di volume osseo, si ritiene che esista una base genetica non ancora determinata, decisiva sia nel processo di incremento che di rimodellamento osseo⁴⁴.

I geni coinvolti nei due fenomeni descritti sono stati identificati attraverso un approccio di estrazione dei dati: il complesso preliminare di geni, tuttavia, ottenuto mediante una ricerca nei *database* e mediante l'analisi delle liste di geni provenienti da *microarray* disponibili in commercio, si avvicinava al numero finale dei geni rilevati (approssimativamente 75% in entrambi i casi). I tre cicli di processi di espansione e filtrazione, eseguiti fino alla convergenza dei dati, hanno condotto alla scoperta dei rimanenti geni coinvolti nei due fenomeni: è chiara, quindi, l'importanza rivestita dall'alternarsi dei processi di espansione e filtrazione per la corretta analisi dei fenomeni.

Il software STRING ha fornito informazioni circa le associazioni combinate previste, con un elevato livello di confidenza (≥ 0.9), ottenute dalla combinazione di *database* riguardanti l'interazione fisica diretta proteina-proteina, l'espressione genica sperimentale, cioè il suo ruolo attivo nelle vie metaboliche, e le associazioni funzionali indirette.

Per ciascuno dei due fenomeni, i geni sono stati classificati in base al numero pesato di interazioni (WNL) con gli altri geni dello stesso set di dati e, mediante il metodo del *gap statistico*, applicato all'analisi *K-means*, è stato calcolato il numero finale di *cluster*.

Studi precedenti^{2,3} avevano accertato il ruolo specifico giocato da limitati set di geni nel ciclo cellulare dei linfociti-T umani e nella malattia parodontale.

Analisi genica del processo di incremento osso

I tre geni appartenenti alle classi superiori, indicati sia dal numero di citazioni che dal numero di interazioni previste come strettamente coinvolti nel processo di incremento osseo, sono VEGFA, BMP2 e TGFB1.

VEGFA

Il gene VEGFA è un membro della famiglia *platelet-derived growth factor (PDGF) / vascular endothelial growth factor (VEGF)* e codifica per una proteina che è un mitogeno glicosilato, che agisce specificamente sulle cellule endoteliali.

Presenta un elevato numero di citazioni (gsc^a=50) in riferimento al processo di incremento osseo.

Le sue funzioni sono abbastanza note in letteratura:

- determina un aumento della permeabilità vascolare;
- induce l'angiogenesi e la vasculogenesi;
- migliora il processo di guarigione negli ampi difetti ossei in cui i sostituti ossei non sarebbero altrimenti vascolarizzati e rimpiazzati da osso neoformato⁴⁵;
- con le BMP_s, in maniera sinergica, favorisce l'aumento della mineralizzazione e della rigenerazione ossea^{46,47}.

BMP2

Appartiene alla superfamiglia di fattori di crescita TGF- β ed è stata usata clinicamente, anche nelle sue forme ricombinanti, per indurre la formazione di nuovo osso^{44,48}.

L'attività osteoinduttiva delle BMP sulle cellule staminali mesenchimali umane primarie (hMSC) suggerisce che differenti meccanismi per le BMP2 e per le BMP_s inducono la differenziazione osteoblastica⁴⁹: BMP2 regola la differenziazione osteoblastica, e, in presenza di RUNX2, supera l'effetto inibitorio di IL-1^{50,51}.

L'elevato gsc non gli conferisce necessariamente importanza biologica ma la sua inclusione nel *cluster* B ne giustifica l'utilizzo nelle strategie di ricostruzione ossea.

TGFB1

È l'ultimo gene del cluster B, potenzialmente coinvolto nell'incremento osseo con un elevato numero di citazioni per questo processo (gsc^a=33).

Membro della superfamiglia delle citochine, *transforming growth factor beta*, presenta varie funzioni:

- controlla la crescita, la proliferazione, la differenziazione cellulare e l'apoptosi;
- è un potente stimolatore della formazione di osso osteoblastico, causando chemiotassi, proliferazione e differenziazione degli osteoblasti coinvolti^{52,53};
- si comporta da fattore di crescita autocrino negativo⁵⁴: alterazioni della sua attivazione e segnalazione possono determinare apoptosi⁵⁵.

Dei 4 geni del cluster B rimanenti coinvolti nel processo di incremento osseo e citati raramente in letteratura in riferimento ad esso, due, IL1B e IL6, codificano per citochine, come tutti i geni citati finora, e due, RUNX2 e FOS, sono fattori di trascrizione.

Interleuchine: IL1B e IL-6

Le interleuchine modulano la funzione delle cellule immunitarie in molti modi e intervengono nella replicazione e nella differenziazione di altri tipi cellulari⁵⁶.

IL1B è prodotta dai macrofagi attivati e stimola la proliferazione dei timociti inducendo il rilascio di IL-2, la maturazione e la proliferazione delle cellule B e l'attività del fattore di crescita fibroblastico.

Le proteine IL-1, definite pirogeni endogeni, sono coinvolte nella risposta infiammatoria e sembrano stimolare il rilascio di prostaglandine e collagenasi dalle cellule sinoviali⁵⁷.

IL-6 presenta diverse funzioni: gioca un ruolo importante nella differenziazione finale delle cellule B in cellule immunoglobuline-secerenti e ha la capacità di stimolare lo sviluppo in osteoblasti dei loro precursori ematopoietici⁵⁸.

Fattori di trascrizione: RUNX2 e FOS

RUNX2 fornisce istruzioni per la produzione di una proteina coinvolta nei processi di sviluppo e mantenimento dell'osso e della cartilagine, si lega a specifiche regioni del DNA e aiuta a dirigere l'attività di alcuni geni.

Presenta una funzione di *master switch*, regolando altri geni coinvolti nello sviluppo delle cellule osteoblastiche.

È un fattore di trascrizione, coinvolto nella differenziazione osteoblastica⁵⁹ e nella morfogenesi scheletrica, che svolge un ruolo essenziale nella

maturazione degli osteoblasti e nell'ossificazione intramembranosa ed endocondrale^{60,61}. TNF- α inibisce RUNX2 in maniera isoforma-specifica⁶², ma non nel processo di incremento osseo. Non appartiene, infatti, ai *cluster* superiori. RUNX2 sembra aver acquisito un ruolo predominante nel processo di incremento osseo proprio a causa dell'assenza del suo inibitore specifico.

FOS è una fosfoproteina nucleare che forma un complesso stretto ma non covalentemente legato con il fattore di trascrizione JUN/AP-1. Nell'eterodimero, c-fos, e nelle regioni basiche JUN/AP-1, ognuno sembra interagire con la metà dei siti simmetrici di DNA.

FOS agisce regolando vari processi:

- lo sviluppo delle cellule destinate alla formazione e al mantenimento dello scheletro;
- la trasduzione dei segnali,
- la proliferazione e la differenziazione cellulare⁶³;
- la determinazione della linea osteoclastico-macrofagica⁶⁴;
- il rimodellamento osseo.

Appartiene al cluster B anche nel processo di rimodellamento osseo.

Analisi genica del processo di riassorbimento osso

Dei 9 geni strettamente coinvolti nel fenomeno di riassorbimento osseo, 3 sono proteine segnale e proteine attivanti la trascrizione.

JUN, FOS e MAPK8 sono potenzialmente in grado di attivare differenti processi, ma l'analisi condotta ha voluto mettere in evidenza solo il loro ruolo nel metabolismo osseo.

Il numero di citazioni (gsc^r) di JUN e FOS ha evidenziato un ruolo già noto di questi fattori di trascrizione nel fenomeno del rimodellamento osseo.

È apparso, invece, nuovo il riscontro di MAPK8 nel *cluster* B, nonostante l'assenza di citazioni ($gsc^r=0$).

Sono stati individuati tre geni *leader* (IL6, JUN e TNF- α) e sei geni appartenenti al *cluster* B (IL2, VEGFA, FOS, TGFB1, IL1, MAPK8).

Su un totale di 128 geni, 31 sono stati definiti *geni orfani* per l'assenza di interazioni con gli altri: sembrano, pertanto, necessari ulteriori studi per comprendere il loro ruolo nelle vie metaboliche considerate.

IL6, VEGFA, FOS, TGFB1 e IL1B sono stati descritti nel processo di

incremento osseo.

In questa seconda analisi, IL6 acquisisce importanza e diventa gene *leader* mentre VEGFA viene retrocesso a gene del *cluster* B.

In base al numero di citazioni, IL6, VEGFA e IL1 rimangono stabili rispetto al processo di incremento osseo mentre FOS e TGFB1, che restano nel cluster B, presentano un numero di citazioni minore, dimostrando che il punteggio gsc deriva solo dal numero di citazioni e non serve a conferire validità biologica.

Sono stati trovati due nuovi geni appartenenti al gruppo dei geni *leader*: TNF- α e JUN. TNF- α risulta uno dei geni con il più alto gsc^r, nel fenomeno di rimodellamento osseo.

Le vie di trasduzione del segnale di TNF- α e IL1 interessano direttamente le funzioni di osteoblasti e osteoclasti in maniera analoga. I differenti segnali convergono, infatti, in vie intracellulari simili, inclusa l'attivazione della MAP-chinasi (MAPK).

TNF- α

TNF- α codifica per una citochina pro-infiammatoria multifunzionale, appartenente alla superfamiglia delle TNF (fattori di necrosi tumorale).

È prodotto principalmente dai macrofagi. È un fattore legante ed esprime le sue funzioni per mezzo dei suoi recettori.

TNF- α è coinvolto nella regolazione di moltissimi processi biologici^{65,66,67}:

- proliferazione e differenziazione cellulare,
- apoptosi,
- metabolismo lipidico;
- coagulazione;
- rimodellamento osseo⁶⁸.

È, inoltre, un potente pirogeno.

JUN

Il fattore di trascrizione JUN è stato isolato dal virus 17 del sarcoma aviario. Codifica per una proteina, molto simile alla proteina virale, che, interagendo con specifiche sequenze *target* di DNA, è coinvolta nella regolazione dell'espressione genica.

JUN è privo di introni ed è localizzato sul braccio corto del cromosoma 1, in 1p32-p31, regione coinvolta nelle anomalie di traslocazione e delezione nei tumori maligni dell'uomo⁶⁹. JUN forma un complesso stretto ma non covalentemente legato con FOS⁶³.

MAPK8

Appartiene al cluster B ed è caratterizzato da un basso gsc^r .

La proteina codificata da MAPK8 appartiene al gruppo delle MAP-chinasi, che agiscono come punto di integrazione di molti segnali biochimici e sono coinvolte in vari processi cellulari, quali proliferazione, differenziazione, regolazione della trascrizione⁷⁰.

Questa chinasi, attivata da numerosi stimoli cellulari, agisce su specifici fattori di trascrizione, promuovendo l'espressione genica immediata o precoce in risposta a vari stimoli cellulari⁷¹.

L'attivazione di questa chinasi da parte di TNF- α è necessaria nel processo di apoptosi indotta da TNF- α ⁷².

IL2

La proteina codificata dal gene IL2 è una citochina molto importante nella proliferazione dei linfociti-B e -T. Il recettore di questa citochina è un complesso proteinico eterotrimerico che condivide una catena γ con IL4 e IL7.

IL2 ha un'espressione monoallelica nei timociti maturi, meccanismo regolatore inusuale per il controllo dell'espressione di un singolo gene. Elevati livelli sierici di IL2 e del suo recettore sono correlati con la severità della malattia cutanea del trapianto contro l'ospite (GVHD = *Graft-Versus-Host Disease*), dopo trapianto di midollo osseo. L'evidenza suggerisce che i due agiscono insieme nel determinare lo sviluppo di GVHD cutaneo⁷⁴.

Le interleuchine giocano un ruolo importante nel processo di riassorbimento osseo⁷⁵, come si evince dalla presenza di 3 interleuchine (IL1B, IL2, IL6) nei *cluster B*. La presenza di IL2 nel cluster B rappresenta una novità per il basso numero di citazioni.

Come è stato suggerito da studi precedenti^{2,3}, un basso punteggio specifico indica che un dato gene presenta un alto numero di associazioni previste da STRING in tutti i *database* ma evidenzia un basso numero di legami nei fenomeni analizzati: i risultati potrebbero, pertanto, essere invalidati da un *bias*.

Osservando i risultati riportati in *Tabella 12* tutti i *geni leader* e tutti i geni del *cluster B*, tranne BMP2, RUNX2 e IL6, hanno punteggi specifici con valori compresi tra 13.4% e 25%.

Nel processo di incremento osseo, il valore del punteggio specifico di

VEGFA è pari a 20.4%, nel cluster B è compreso tra 14.7 e 49%.

Nel processo di rimodellamento osseo, il punteggio specifico è compreso tra 13.4 e 30.45 nel cluster dei *geni leader* e tra 15 e 25% nel *cluster B*.

Una possibile spiegazione del riscontro di un punteggio specifico maggiore nel fenomeno dell'incremento osseo può essere ricercata nel maggior numero di procedure prese in esame durante la ricerca, rispetto al gruppo del rimodellamento per cui sono state eseguite ricerche meno dettagliate.

Lo scopo di questa ricerca era quello di identificare *set* di geni, classificati in base alla loro presunta importanza nei fenomeni analizzati.

L'aver scoperto che un limitato numero di geni (citochine e fattori di trascrizione) sembra controllare i fenomeni analizzati suggerisce la necessità di ulteriori esperimenti circa i legami esistenti tra il fattore di trascrizione e la corrispondente citochina, in grado di attivare specifiche vie metaboliche.

Alla luce dei risultati ottenuti, si ipotizzano due possibili comportamenti: nel processo di incremento osseo, RUNX2 sembra giocare un ruolo cruciale ma in assenza di un ruolo simile del TNF- α ; nel processo di rimodellamento osseo, il ruolo cruciale di FOS, JUN e MAPK8 sembra, invece, realizzarsi grazie all'attività sia di IL1B che di TNF- α .

In quest'ottica, potrebbe essere risolutiva un'analisi con *microarray* personalizzati, eseguita valutando i *set* genici identificati dal presente studio, e, in particolar modo i fattori di trascrizione e i *geni orfani*, il cui ruolo rimane sconosciuto.

Conclusioni

È stata eseguita una valutazione del rimodellamento osseo su due livelli, uno clinico-radiografico e uno genico, in modo tale da valutare sia le caratteristiche tridimensionali degli innesti autologhi e dei siti riceventi sia le variabili geniche, e, quindi, la predicibilità degli innesti posizionati.

In una prima fase dello studio, è stata eseguita una valutazione del riassorbimento di innesti ad *inlay* posizionati nel seno mascellare, prelevati da cresta iliaca, e di innesti ad *onlay* posizionati nella regione mandibolare posteriore e nella regione frontale mascellare, prelevati sempre da cresta iliaca.

Degli innesti ad *inlay* mascellari, sono state misurate le correlazioni esistenti tra la percentuale di innesto residuo ad un anno dalla chirurgia incrementale e diverse variabili, misurate e derivate dall'analisi dell'innesto appena prima del posizionamento degli impianti osteodentari (CS_{T_1} , SS_{T_1} , BB_{T_1} , $indexV_{T_1}$, $indexH_{T_1}$ ed $indexS_{T_1}$) e sono stati realizzati *fitting* lineari bidimensionali per gli *scatter plot* $R\%$ vs CS_{T_1} e $R\%$ vs BB_{T_1} .

Degli innesti ad *onlay* mandibolari, sono state misurate le correlazioni esistenti tra la percentuale di innesto residuo ad oltre un anno dalla chirurgia ricostruttiva e le stesse grandezze viste per le procedure di *sinus lift*, e sono stati realizzati *fitting* lineari bidimensionali per gli *scatter plot* $R\%$ vs $IndexV_{T_1}$ ed $R\%$ vs $IndexH_{T_1}$.

Per gli innesti ad *onlay* mascellari, sono stati realizzati *fitting* lineari bidimensionali per gli *scatter plot* $R\%$ vs BB_{T_1} ed $R\%$ vs $indexS_{T_1}$.

È stata trovata una correlazione tra bassi valori di $IndexS_{T_1}$, alti valori di BB_{T_1} e $R\%$ e questo ci suggerisce come innesti prelevati da cresta iliaca arrotondati e con superficie esterna convessa, posizionati nella mandibola posteriore con un adeguato volume osseo basale, presentino un riassorbimento minore. È forse quindi indicato, dopo la fissazione con mezzi da osteosintesi, procedere alla smussatura dei margini dell'innesto che solitamente mal si adattano al sito ricevente ed ai tessuti molli che lo circondano; questo, oltre a migliorare il comfort post-operatorio per il paziente, potrebbe ridurre il riassorbimento degli innesti.

Per tutti i tipi di innesto, è stata calcolata la matrice di rimodellamento dell'innesto dal tempo T_1 al tempo T_2 per il sistema osseo-implantare ed è stata calcolata la sopravvivenza implantare nelle aree ricostruite, che ha riportato valori in linea con la letteratura attuale.

Poiché le proprietà dell'innesto osseo oltre alle sue caratteristiche tridimensionali ed alla densità, per esempio la composizione ed il rapporto corticale/midollare, possono interferire con il suo rimodellamento, potrebbe risultare molto utile un'ulteriore analisi multidimensionale della struttura dell'osso allo scopo di arrivare ad una previsione più accurata del riassorbimento.

In una seconda fase dello studio, mediante un processo di estrazione dei dati, è stata eseguita una identificazione *de novo* dei geni *leader* coinvolti nei processi di incremento e di rimodellamento osseo, al fine di acquisire informazioni iniziali sulle loro basi molecolari e di programmare successivi esperimenti *ad hoc*.

Per ogni fenomeno analizzato, sono stati identificati due *set* genici, per un totale di 7 geni nel fenomeno di incremento osseo e di 9 geni nel fenomeno di rimodellamento osseo.

I due set di dati hanno evidenziato la necessità di descrivere i fenomeni in esame sulla base di un'integrazione di tutte le informazioni disponibili, sia teoriche che sperimentali.

Solo due geni coinvolti nell'incremento osseo (BMP2 e TGFB1) ed un gene coinvolto nel rimodellamento (TNF- α) presentano un elevato WNL ed un alto gsc^r , ricavati dai dati presenti in letteratura.

Molti geni appartenenti ai *cluster* superiori presentano un ruolo già noto nei processi ossei ma l'analisi eseguita suggerisce che essi giochino un ruolo cruciale nei fenomeni analizzati.

Il ruolo giocato dai fattori di trascrizione e dai numerosi *geni orfani*, per cui mancano informazioni sufficienti, potrebbe essere chiarito da ulteriori esperimenti con DNA-*microarray* specifici e mirati.

Appendici

Appendice A

```
% Insert square dimension of the TC image expressed in cm
% for Example
% DTC=13.8
% Paolo Toti 29/03/2007 19:07$
DTC=13.8
sequenceStartNo=1;
sequenceEndNo=39;
pathor='c:\origine\mandplane\originalmandb\'
pathormet='c:\origine\mandplane\originalmanda\'
pathfin='c:\origine\mandplane\resizeb\'
basename='IM';
fileExtension='.dcm'
Nmin=sequenceStartNo;
Nmax=sequenceEndNo;
FC=DTC./16
mrows=round(512./FC)
ncols=round(512./FC)
method='bilinear'
KL1=zeros(512,512,sequenceEndNo);
tic
fileCount=1;
totalFiles = sequenceEndNo - sequenceStartNo;
if totalFiles < 0
error('sequenceStartNo is higher than sequenceEndNo..consider flipping ')
return;
end
for i=sequenceStartNo:sequenceEndNo
if i < 10
sequenceNo = strcat('000',num2str(i));
elseif ((10 <= i ) & (i < 100))
sequenceNo = strcat('00',num2str(i));
```

```

elseif ((100 <= i) & (i < 1000))
sequenceNo = strcat('0', num2str(i));
elseif 1000 < i
end
filename = strcat(pathor, basename, sequenceNo, fileExtension);
[dicomVolume(:,:,i+1), map] = dicomread(filename);
dcm(:,:,i) = dicomVolume(:,:,i);
E(:,:,i) = imresize(dcm(:,:,i), [mrows ncols], method);
dimx = 512 - mrows;
KL01 = zeros(mrows, dimx);
KL02 = int16(KL01);
C(:,:,i) = horzcat(E(:,:,i), KL02);
dimy = 512 - ncols;
KL03 = zeros(dimy, 512);
KL04 = int16(KL03);
D(:,:,i) = vertcat(C(:,:,i), KL04);
filename = strcat(pathormet, basename, sequenceNo, fileExtension);
filename2 = strcat(pathfin, basename, sequenceNo, '.dcm');
metadata = dicominfo(filename);
dicomwrite(D(:,:,i), filename2, metadata)
if fileCount == 1
dicomHeaderInfo = dicominfo(filename)
isotropicVoxelDimension = dicomHeaderInfo.PixelSpacing(1);
end
fileCount = fileCount + 1;
end
toc
imagesc(D(:,:,i), [0 4096]); colormap(gray);
FOV 138 mm

```

Appendice B

```
% Paolo Toti 08-05-2007: 16.12$
% start
% Section number
SN=1
Sec=1
%Points and sections
PmR3=[5.229 2.938 17]
PmL3=[8.787 3.073 14]
XiR3=[3.046 8.679 32]
XiL3=[10.997 8.814 24]
PmR2=PmL3;
PmL2=PmR3;
XiR2=XiL3;
XiL2=XiR3;
PmR1=[PmR2(2) (PmR2(1)) PmR2(3)]
PmL1=[PmL2(2) (PmL2(1)) PmL2(3)]
XiR1=[XiR2(2) (XiR2(1)) XiR2(3)]
XiL1=[XiL2(2) (XiL2(1)) XiL2(3)]
oi=512./16;
XiR=[XiR1(1).*oi XiR1(2).*oi XiR1(3)]
XiL=[XiL1(1).*oi XiL1(2).*oi XiL1(3)]
PmR=[PmR1(1).*oi PmR1(2).*oi PmR1(3)]
PmL=[PmL1(1).*oi PmL1(2).*oi PmL1(3)]
Xic=(XiL+XiR)./2;
Pmc=(PmL+PmR)./2;
center=(Pmc+Xic)./2;
sequenceStartNo=1;
sequenceEndNo=39;
finalZsectional=20
path='c:\origine\mandplane\resizeb\'
path2='c:\origine\mandplane\reformatmandb\'
basename='IM';
fileExtension='.dcm'
Nmin=sequenceStartNo;
```

```

Nmax=sequenceEndNo;
dec=1;
inc=1;
% %Gives Volume Matrix conatining all the dicom files read in sequence
%
% Output Arguments
% dicomVolume          = MxNxP matrix where M x N is image
%                       array and P indicates img no.
% isotropicVoxelDimension = scalar element giving voxel
%                       dimension based on the
%                       'dicomHeaderInfo'(described below).
% dicomHeaderInfo      = supplies dicom header info for the
%                       first dicom file only.
% NOTE: It is assumed that this is an isotropic volume and all dicom
% files belong to the same volume. If you don't have isotrtopic you
% will have to modify the input for 'isotropicVoxelDimension'.
%
% Input Arguments
% sequenceStartNo = Starting sequence number from the first dicom
%                  image file to be read.
%                  (e.g xxx_0010.dcm...xxx_0500.dcm - "10" is
%                  your sequenceStartNo)
% sequenceEndNo   = Ending sequence number for the last dicom
%                  image
%                  file to be read.
%                  (e.g xxx_0000.dcm...xxx_0500.dcm - "500" is
%                  your sequenceEndNo)
% path            = path in which we find the dicom files
% basename        = Common name of the file sequence (e.g
% ATLAS_0001.dcm,
% ATLAS_0002.dcm,ATLAS_0003.dcm,...ATLAS_00199.dcm
%                  has basename = 'ATLAS_')
% fileExtension   = extension of the image .dcm or dicom.
%
% Assumptions
% - All files are sequentially in the correct order.

```

```

% - All files are dicom files belonging to the same volume.
% - Numbering of dicom files consist of 4 digits
%   e.g 0001.dcm,0002.dcm,..9999.dcm
tic
fileCount=1;
totalFiles = sequenceEndNo - sequenceStartNo;
if totalFiles < 0
error('sequenceStartNo is higher than sequenceEndNo..consider flipping ')
return;
end
for i=sequenceStartNo:sequenceEndNo
if i < 10
sequenceNo = strcat('000',num2str(i));
elseif ((10 <= i ) & (i < 100))
sequenceNo = strcat('00',num2str(i));
elseif ((100 <= i ) & (i <1000))
sequenceNo = strcat('0',num2str(i));
elseif 1000 < i
error('More than 1000 files selected')
end
filename=strcat(path,basename,sequenceNo,fileExtension);
[dicomVolume(:, :,i),map]= dicomread(filename);
E(:, :,i)=dicomVolume(:, :,i);
end
% dimension image
J03=TRIPLANE4(center,Nmin,Nmax,Sec,PmL,PmR,xiL,xiR);
J04=[J03(1)+256 J03(2)+256 J03(3)+finalZsectional];
J05=(round(J04))
D01=zeros(512,512,sequenceEndNo);
for i=1:sequenceEndNo
d=512;
for h = 1:d;
for j = 1:d;
P=[h j i];
A01=TRIPLANE4(P,Nmin,Nmax,Sec,PmL,PmR,xiL,xiR);
B01=[A01(1)+256 A01(2)+256 A01(3)+finalZsectional];

```

```

C01=(round(B01));
if C01(1) >= 1 && C01(1) <= 512
if C01(2) >= 1 && C01(2) <= 512
if C01(3) >=1 && C01(3) <= sequenceEndNo
D01(C01(1),C01(2),C01(3))=E(h,j,i);
end
end
end
end
end
end
end
imagesc(D01(:,:,i),[0 4096]); colormap(gray);
for s=sequenceStartNo:sequenceEndNo
H01=ones(512,512,sequenceEndNo);
[q,w] = find(D01(:,:,s) < 1);
E01=[q,w];
m=size(q);
for u=1:m
H01(E01(u1),E01(u2),s)=D01(E01(u1),E01(u2),s);
end
H02(:,:,s)=abs(H01(:,:,s)-1);
H03(:,:,s)=D01(:,:,s);
H04(:,:,s)=ordfilt2(H03(:,:,s),5,ones(3,3));
end
H05=H02.*H04;
H06=D01+H05;
imagesc(H06(:,:,s),[0 4096]); colormap(gray);
for i=sequenceStartNo:sequenceEndNo
if i < 10
sequenceNo = strcat('000',num2str(i));
elseif ((10 <= i) & (i < 100))
sequenceNo = strcat('00',num2str(i));
elseif ((100 <= i) & (i <1000))
sequenceNo = strcat('0',num2str(i));
elseif 1000 < i
error('More than 1000 files selected')

```

```
end
filename=strcat(path,basename,sequenceNo,fileExtension);
filename2=strcat(path2,basename,sequenceNo,'.dcm');
metadata = dicominfo(filename);
X17(:,:,i) = int16(H06(:,:,i) - 1);
dicomwrite(X17(:,:,i),filename2, metadata)
if fileCount == 1
dicomHeaderInfo = dicominfo(filename)
isotropicVoxelDimension = dicomHeaderInfo.PixelSpacing(1);
end
fileCount = fileCount + 1;
end
toc
```

Appendice C

```
function CORD=TRIPLANE4(P,Nmin,Nmax,Sec,PmL,PmR,xiL,xiR)
% Section
S=(Sec+1)-(Nmin);
% TRIPLANE computes the sets of the coordinates x and y and z for
% the reformattation of the dicom file of the mandibular plane.
%
% Nmin is the number of minimal section
% Nmax is the number of maximal section
% Sec is the number of section included in Nmin-Nmax range
% PmL,PmR,xiL and xiR are the characterist mandibular points
% as matrix 1x3 with x and y expressed as pixel and z expressed
% as number TAC section
% The Tac section is positioned with frontal side downwards and
% the zero of the axis is downwards in the left side.
% P is the point as a matrix 1x3 (x,y and z coordinates)
% Toti Paolo 29/03/2007 19:07$
Xic=(xiL+xiR)./2;;
Pmc=(PmL+PmR)./2;
center=(Pmc+Xic)./2;
PP=Pmc;
PT=Xic;
% plane equation for three point (jaw plane)
a1=((xiL(:,2)-Pmc(:,2)).*(xiR(:,3)-Pmc(:,3)))-((xiL(:,3)-Pmc(:,3)).*(xiR(:,2)-
Pmc(:,2)));
a2=-((xiL(:,1)-Pmc(:,1)).*(xiR(:,3)-Pmc(:,3)))+((xiR(:,1)-Pmc(:,1)).*(xiL(:,3)-
Pmc(:,3)));
```

```

a3=((XiL(:,1)-Pmc(:,1)).*(XiR(:,2)-Pmc(:,2)))-((XiR(:,1)-Pmc(:,1)).*(XiL(:,2)-
Pmc(:,2)));
a4=-((a1.*Pmc(:,1))+a2.*Pmc(:,2))+a3.*Pmc(:,3));
% plane hortogonal to the jaw plane and passing for two point (median
plane)
b1=(a3.*(PP(:,2)-PT(:,2)))-(a2.*(PP(:,3)-PT(:,3)));
b2=-(a3.*(PP(:,1)-PT(:,1)))+(a1.*(PP(:,3)-PT(:,3)));
b3=(a2.*(PP(:,1)-PT(:,1)))-(a1.*(PP(:,2)-PT(:,2)));
b4=-((b1.*PT(:,1)))+(b2.*PT(:,2)))+(b3.*PT(:,3));
% plane hortogonal to the jaw plane and to the median plane and passing
for certer point
c1=PP(:,1)-PT(:,1);
c2=PP(:,2)-PT(:,2);
c3=PP(:,3)-PT(:,3);
c4=-(c1.*center(1)+c2.*center(2)+c3.*center(3));
zminD=(a1.*P(1)+a2.*P(2)+a3.*P(3)+a4)./(sqrt(a1.^2+a2.^2+a3.^2));
xminD=(b1.*P(1)+b2.*P(2)+b3.*P(3)+b4)./(sqrt(b1.^2+b2.^2+b3.^2));
yminD=(c1.*P(1)+c2.*P(2)+c3.*P(3)+c4)./(sqrt(c1.^2+c2.^2+c3.^2));
CORD=[xminD yminD zminD];

```

Appendice D

Consideriamo quindi nello spazio un piano p di equazione cartesiana:

$$p : \quad ax + by + cz + d = 0$$

ed un punto:

$$P_0 = (x_0, y_0, z_0).$$

La retta passante per P_0 e perpendicolare al piano p intersecherà il piano in un punto $Q = (x_1, y_1, z_1)$, dunque la distanza punto-piano: $d(P_0, p) = d(P_0, Q)$:

$$d(P_0, p) = \frac{|ax_0 + by_0 + cz_0 + d|}{\sqrt{a^2 + b^2 + c^2}}$$

dove il numeratore rappresenta il piano passante per il punto P_0 e il denominatore la norma del vettore normale al piano.

Ossia la distanza minima oggettiva di un punto P da un piano α , si calcola come misura di un segmento \overline{PQ} appartenente ad una retta r ortogonale ad α . In cui un estremo è il punto P , come presupposto, e l'altro estremo si determina come punto d'intersezione tra r con α .

Di norma la procedura atta a determinare un punto Q come intersezione di una retta r con un piano α , consiste nel far appartenere r ad un piano ausiliario β , che nella maggior parte dei casi ha giacitura verticale. Il quale seziona il piano α secondo una retta s . In questo modo si individua il punto Q come intersezione delle rette r ed s .

Appendice E

```
function B = ordfilt2(varargin)
%ORDFILT2 Perform 2-D order-statistic filtering.
% B=ORDFILT2(A,ORDER,DOMAIN) replaces each element in A by the
% ORDER-th element in the sorted set of neighbors specified by
% the nonzero elements in DOMAIN.
%
% B = ORDFILT2(A,ORDER,DOMAIN,S), where S is the same size as
% DOMAIN, uses the values of S corresponding to the nonzero
% values of DOMAIN as additive offsets.
%
% B = ORDFILT2(...,PADOPT) controls how the matrix boundaries
% are padded. PADOPT may be 'zeros' (the default) or
% 'symmetric'. If PADOPT is 'zeros', A is padded with zeros at
% the boundaries. If PADOPT is 'symmetric', A is symmetrically
% extended at the boundaries.
%
% Class Support
% -----
% The class of A may be numeric or logical. The class of B is
% the same as the class of A, unless the additive offset form of
% ORDFILT2 is used, in which case the class of B is double.
%
% Example
% -----
% Use a maximum filter on snowflakes.png with a [5 5] neighborhood.
This is
% equivalent to imdilate(image,strel('square',5)).
%
%   A = imread('snowflakes.png');
%   B = ordfilt2(A,25,true(5));
%   figure, imshow(A), figure, imshow(B)
%
% Remarks
% -----
```

```

% DOMAIN is equivalent to the structuring element used for
% binary image operations. It is a matrix containing only 1's
% and 0's; the 1's define the neighborhood for the filtering
% operation.
%
% For example, B=ORDFILT2(A,5,ONES(3,3)) implements a 3-by-3
% median filter; B=ORDFILT2(A,1,ONES(3,3)) implements a 3-by-3
% minimum filter; and B=ORDFILT2(A,9,ONES(3,3)) implements a
% 3-by-3 maximum filter. B=ORDFILT2(A,4,[0 1 0; 1 0 1; 0 1 0])
% replaces each element in A by the maximum of its north, east,
% south, and west neighbors.
%
% See also MEDFILT2.
% Copyright 1993-2004 The MathWorks, Inc.
% $Revision: 5.17.4.6 $ $Date: 2004/08/10 01:41:00 $
[A,order,domain,s,padopt,msg] = ParseInputs(varargin{:});
domainSize = size(domain);
center = floor((domainSize + 1) / 2);
[r,c] = find(domain);
r = r - center(1);
c = c - center(2);
padSize = max(max(abs(r)), max(abs(c)));
originalSize = size(A);
if (strcmp(padopt, 'zeros'))
A = padarray(A, padSize * [1 1], 0, 'both');
elseif (strcmp(padopt, 'ones'))
% padopt of 'ones' is for support of medfilt2; it is
% undocumented
A = padarray(A, padSize * [1 1], 1, 'both');
else
A = padarray(A, padSize * [1 1], 'symmetric', 'both');
end
Ma = size(A,1);
offsets = c*Ma + r;
% make sure that offsets are valid
if ~isreal(offsets) || any(floor(offsets) ~= offsets) || any(~isfinite(offsets))

```

```

%should never get here
eid = sprintf('Images:%s:internalError', mfilename);
msg = 'Internal error: bad OFFSETS.';
error(eid,'%s',msg);
end
if isempty(s)
%ORDFILT2(A,ORDER,DOMAIN)
B = ordf(A, order, offsets, [padSize padSize] + 1, ...
originalSize, domainSize);
else
%ORDFILT2(A,ORDER,DOMAIN,S,PADOPT)
B = ordf(A, order, offsets, [padSize padSize] + 1, ...
originalSize, domainSize, s);
end
%%%
%%% ParseInputs
%%%
function [A,order,domain,s,padopt,msg] = ParseInputs(varargin)
A = [];
order = [];
domain = [];
s = [];
padopt = 'zeros';
msg = '';
iptchecknargin(3,5,nargin,mfilename);
A = varargin{1};
order = varargin{2};
domain = varargin{3};
options = {'zeros', 'ones', 'symmetric'};
% padopt of 'ones' is for supporting medfilt2; it is undocumented.
if (nargin == 4)
if (ischar(varargin{4}))
padopt = iptcheckstrs(varargin{4},options,mfilename,'PADOPT',4);
else
s = varargin{4};
end
end

```

```

elseif (nargin == 5)
s = varargin{4};
padopt = iptcheckstrs(varargin{5},options,mfilename,'PADOPT',5);
end
% make sure that arguments are valid
iptcheckinput(order,{'double'},{'real','scalar','integer'},mfilename, ...
'ORDER',2);
if ~isempty(s)
if (~isa(A, 'double'))
A = double(A);
end
iptcheckinput(A, {'double'}, {'2d','real'}, mfilename, 'A', 1);
s = s(find(domain));
iptcheckinput(s, {'double'}, {'real'}, mfilename, 'S', 4);
else
iptcheckinput(A, {'numeric','logical'}, {'2d','real'}, mfilename, 'A', 1);
end

```

Appendice F

```
BB=[];
indexS=[];
r=[];
B=10.*BB./max(BB)
S=10.*indexS./max(indexS)
R=r./100;
X = [H(:) V(:)];
X1 = [H(:) V(:) R(:)];
T = delaunayn(X,{'Qt','Qbb','Qc','Qz'})
K=zeros(3,3,size(T,1))
for i=1:size(T,1);
K(-,i)=X1(T(i,,:));
end
tot=zeros(11,11,size(T,1));
for j=1:size(T,1);
for x=0:10
for y=0:10
dis1=sqrt((x-K(1,1,j)).^2+(y-K(1,2,j)).^2);
dis2=sqrt((x-K(2,1,j)).^2+(y-K(2,2,j)).^2);
dis3=sqrt((x-K(3,1,j)).^2+(y-K(3,2,j)).^2);
disT1=(1./dis1)+(1./dis2)+(1./dis3);
val=(1/(dis1.*disT1)).*K(1,3,j)+(1/(dis2.*disT1)).*K(2,3,j)+(1/(dis3.*disT1))
.*K(3,3,j);
tot((x+1),(y+1),j)=val;
end
end
end
A2=zeros(11,11);
for x2=0:1:10
for y2=0:1:10
XII=[x2 y2];
[k,d] = dsearchn(X,T,XII)
T1=find(T == k);
for q=1: size(T1);
```

```

if T1(q) > size(T,1)
T1(q)=T1(q)-size(T,1);
end
end
for q=1: size(T1);
if T1(q) > size(T,1)
T1(q)=T1(q)-size(T,1);
end
end
for q=1: size(T1);
if T1(q) > size(T,1)
T1(q)=T1(q)-size(T,1);
end
end
A=zeros(11,11);
for t=1:size(T1,1);
A=A+tot(:, :, T1(t));
end
B=A./size(T1,1);
A2((XII(1)+1),(XII(2)+1))=B((XII(1)+1),(XII(2)+1));
end
end
[xi,yi] = meshgrid(0:1:10, 0:1:10);
[xii,yii] = meshgrid(0:.1:10, 0:.1:10);
vii = interp2(xi,yi,A2,xii,yii);
imagesc(viii),shading flat,colorbar

```

Bibliografia

1. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17 Suppl 2:136-59.
2. Sivozhelezov V, Giacomelli L, Tripathi S, Nicolini C. Gene expression in the cell cycle of human T lymphocytes: I. Predicted gene and protein networks. *J Cell Biochem.* 2006 Apr 1;97(5):1137-50.
3. Covani U, Marconcini S, Giacomelli L, Sivozhelevov V, Barone A, Nicolini C. Bioinformatic prediction of leader genes in human periodontitis. *J Periodontol.* 2008 Oct;79(10):1974-83. Erratum in: *J Periodontol.* 2010 Aug;81(8):1237.
4. Wolff J. The laws of bone remodelling (translated by Maquet P and Furlong R). Berlin, 1986, Springer.
5. Roberts WE et al. Bone physiology and metabolism. *Cal Dent Assoc J* 1987;15:54-61.
6. Tallgren A: The reduction in face height of edentulous and partially edentulous subject during long-term denture wear: a longitudinal roentgenographic cephalometric study, *Acta Odontol Scand* 24: 195-239, 1966
7. Cawood JI, Howell RA. A classification of edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988; 17: 232-236.
8. Cawood JI, Howell RA. Reconstructive preprosthetic surgery I. Anatomical considerations. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1991; 20: 75-82.
9. Rossi A, Chiapasco M: Il rialzo del seno mascellare a scopo implantologico: classificazione del deficit osseo, tecniche di trattamento e biomateriali impiegabili. *Implantologia* 2004: 1; 41-57
10. Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. editors: *Tissue integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry.* Quintessence, Chicago 1985; 199-209.
11. Misch CE. Bone classification, training keys to implant success. *Dent Today.* 1989 May;8(4):39-44.
12. Hagi D, Deporter DA, Pilliar RM, Arenovich T. A targeted review of study outcomes with short (< or = 7 mm) endosseous dental implants

- placed in partially edentulous patients. *J Periodontol.* 2004 Jun;75(6):798-804.
13. Peetz M. Characterization of xenogenic bone material (Appendix). In Boyne PJ, editor: *Osseous reconstruction of the maxilla and the mandible.* Quintessence. Chicago, 1997; 87-100.
 14. Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:891–897.
 15. Hardesty RA, Marsh JL. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation, and embryonic origin. *Plast Reconstr Surg* 1990; 85(1): 5-14.
 16. La Trenta GS, Mc Carthy JG, Breitbart AS et al. The role of rigid skeletal fixation in bone graft augmentation of the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg* 1989; 84(4):578-588.
 17. Philips JH, Rahn BA. Fixation effects of membranous and endochondral onlay bone-graft resorption. *Plast reconstr Surg* 1988; 82(5): 872.877.
 18. Lin KY, Barlett SP, Yaremchuk MJ, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1990 Sep; 86(3): 449-456.
 19. Lawrence T, Steven R, Buchman. Facial bone grafts: contemporary science and thought. *J of Cranio-Maxillofacial Trauma* 2000; 6(1): 31-41.
 20. Brånemark PI, Lindstrom J, Hallen O et al. Reconstruction of the defective mandible. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1975; 9: 116-128.
 21. Kratochivil FJ, Boyne PJ. The combined use of a subperiosteal implant and bone marrow grafts in efficient mandibole. *J Prosthet Dent* 1972; 27: 645-653.
 22. Breine U, Brånemark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980; 14: 23-48.
 23. Grillon GL, Gunther SF, Connole PW. A new technique of obtaining iliac bone graft. *J Oral Maxillofac Surg* 1984;42:172–176.
 24. Politi M, Robiony M, Demitry V. Descrizione delle tecniche chirurgiche per il prelievo di osso autologo dall'ala iliaca anteriore (proposta di modifica chirurgica). *Riv It Chir Max Facc.* 1995;6:511.

- 25.Reconstruction of the severely atrophic edentulous mandible with endosseous implants: a 10-year longitudinal study. Keller EE. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Mar;53(3):305-20.
- 26.Triplett RG, Schow SR. Autologous Bone grafts and Endosseous Implants: complementary techniques. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54:486-494.
- 27.Bell RB, Blakey GH, White RP, Hillebrand DG, Molina A. Staged reconstruction of the severely atrophic mandible with autogenous bone graft and endosteal implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Oct;60(10):1135-41.
- 28.McAllister BS, Haghghat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):377-96.
- 29.Sailer HF. The principles of removal of the sinus floor mucosa for new preprosthetic reconstruction methods (sinus inlay method). In: Fonseca R.J. & Davis W.H. *Reconstructive Preprosthetic Oral and Maxillofacial Surgery.* 2nd edition, 457-464. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- 30.Sbordone C, Sbordone L, Toti P, Martuscelli R, Califano L, Guidetti F. Volume changes of grafted autogenous bone in sinus augmentation procedure. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Jun;69(6):1633-41. Epub 2011 Mar 21.
- 31.Schaaf H, Kaubruegge S, Streckbein P, Wilbrand JF, Kerkmann H, Howaldt HP.Comparison of miniplate versus lag-screw osteosynthesis for fractures of the mandibular angle.*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Jan;111(1):34-40. Epub 2010 Jul 2.
- 32.Rehrmann A. Plastic surgery of the facial-maxillary area. *HNO.* 1957 May 31;6(5):139-44.
- 33.Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success.*Int J Oral Maxillofac Implants.* 1986 Summer;1(1):11-25. Review.
- 34.Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris G, Sbordone C, Guidetti F.Implant survival in maxillary and mandibular osseous onlay grafts and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Jul-Aug;24(4):695-703.

35. Smolka W, Eggensperger N, Carollo V, Ozdoba C, Iizuka T. Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 149–155.
36. Krennmair G, Krainhöfner M, Maier H, Weinländer M, Piehslinger E. Computerized tomography-assisted calculation of sinus augmentation volume. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Nov-Dec;21(6):907-13
37. Fitzpatrick RB. ISI's Journal Citation Reports on the Web. *Med Ref Serv Q*. 2003 Winter;22(4):45-56.
38. Johansson, B., Grepe, A., Wabfbors, K. & Hirsch, J.M. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofacial Radiology* 2001;30:157-161.
39. Sivarajasingam, V., Pell, G., Morse, M. & Shepherd, J.P. Secondary bone grafting of alveolar clefts: a densitometric comparison of iliac crest and tibial bone grafts. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 2001;38:11-14.
40. Hardesty RA, Marsh JL. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation, and embryonic origin. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Jan;85(1):5-14; discussion 15.
41. Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Jun;85(6):891-7.
42. Buchman SR, Ozaki W. The ultrastructure and resorptive pattern of cancellous onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg*. 1999 Jul;43(1):49-56.
43. Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol*. 2001 May;30(3):157-61.
- 44.
45. Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P, Claes L, Augat P, Richter W. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone*. 2007 Oct;41(4):516-22. Epub 2007 Jul 6.
46. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest*. 2002 Sep;110(6):751-9.

47. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem*. 2005 Jul 1;95(4):827-39.
48. Wikesjö UM, Huang YH, Polimeni G, Qahash M. Bone morphogenetic proteins: a realistic alternative to bone grafting for alveolar reconstruction. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007 Nov;19(4):535-51, vi-vii. Review.
49. Jung RE, Thoma DS, Hammerle CH. Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):255-81. Review.
50. Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*. 2008 Jul 25;283(30):20948-58. Epub 2008 Apr 24.
51. Sowa H, Kaji H, Hendy GN, Canaff L, Komori T, Sugimoto T, Chihara K. Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor beta-regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2. *J Biol Chem*. 2004 Sep 24;279(39):40267-75. Epub 2004 May 18.
52. Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol*. 2001 Dec;189(3):275-84.
53. Ortiz CO, Chen BK, Bale LK, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Transforming growth factor-beta regulation of the insulin-like growth factor binding protein-4 protease system in cultured human osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2003 Jun;18(6):1066-72.
54. Wright N, de Lera TL, García-Moruja C, Lillo R, García-Sánchez F, Caruz A, Teixidó J. Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):1978-84. Epub 2003 May 29.
55. Carinci F, Palmieri A, Martinelli M, Perrotti V, Piattelli A, Brunelli G, Arlotti M, Pezzetti F. Genetic portrait of osteoblast-like cells cultured on PerioGlas. *J Oral Implantol*. 2007;33(6):327-33.

56. Baughn LB, Di Liberto M, Niesvizky R, Cho HJ, Jayabalan D, Lane J, Liu F, Chen-Kiang S. CDK2 phosphorylation of Smad2 disrupts TGF-beta transcriptional regulation in resistant primary bone marrow myeloma cells. *J Immunol*. 2009 Feb 15;182(4):1810-7.
57. Halle M, Berg A, Northoff H, Keul J. Importance of TNF-alpha and leptin in obesity and insulin resistance: a hypothesis on the impact of physical exercise. *Exerc Immunol Rev*. 1998;4:77-94. Review.
58. Palomo I, Alarcón M, Moore-Carrasco R, Argilés JM. Hemostasis alterations in metabolic syndrome (review). *Int J Mol Med*. 2006 Nov;18(5):969-74. Review.
59. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*. 2008 May 1;13:5094-107. Review.
60. Santos FR, Moysés RM, Montenegro FL, Jorgetti V, Noronha IL. IL-1beta, TNF-alpha, TGF-beta, and bFGF expression in bone biopsies before and after parathyroidectomy. *Kidney Int*. 2003 Mar;63(3):899-907.
61. Haluska FG, Huebner K, Isobe M, Nishimura T, Croce CM, Vogt PK. Localization of the human JUN protooncogene to chromosome region 1p31-32. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Apr;85(7):2215-8.
62. Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev*. 2005 Dec;208:126-40. Review.
63. Cuevas BD, Abell AN, Johnson GL. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3159-71. Review.
64. Chung KC, Kim SM, Rhang S, Lau LF, Gomes I, Ahn YS. Expression of immediate early gene pip92 during anisomycin-induced cell death is mediated by the JNK- and p38-dependent activation of Elk1. *Eur J Biochem*. 2000 Aug;267(15):4676-84.
65. Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell*. 2003 Oct 3;115(1):61-70.
66. Takatsuka H, Takemoto Y, Yamada S, Mori A, Wada H, Fujimori Y, Okamoto T, Kanamaru A, Kakishita E. Similarity between eruptions induced by sulfhydryl drugs and acute cutaneous graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Hematology*. 2002 Feb;7(1):55-7.

67. Rifas L. Bone and cytokines: beyond IL-1, IL-6 and TNF-alpha. *Calcif Tissue Int.* 1999 Jan;64(1):1-7. Review. No abstract available.
68. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 1990 Aug;4(11):2860-7. Review.
69. Fioravanti A, Moretti E, Scapigliati G, Cervone R, Galeazzi M, Collodel G. Morphological, immunocytochemical and biochemical studies in human osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1b and cyclical hydrostatic pressure. *Clin Exp Rheumatol.* 2007 Sep-Oct;25(5):690-5.
70. Ihara H, Hirukawa K, Goto S, Togari A. nATP-stimulated interleukin-6 synthesis through P2Y receptors on human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jan 14;326(2):329-34.
71. Brubaker KD, Vessella RL, Brown LG, Corey E. Prostate cancer expression of runt-domain transcription factor Runx2, a key regulator of osteoblast differentiation and function. *Prostate.* 2003 Jun 15;56(1):13-22.
72. Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005 Sep;75(3):213-25.
73. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:898-903. Review.
74. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 2002 Jan 25;277(4):2695-701. Epub 2001 Nov 26.
75. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature.* 2002 Apr 18;416(6882):744-9.