

POLITECNICO DI TORINO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea

Metanalisi clinica e istologica della rigenerazione ossea in campo orale con SmartBone



Relatore: Prof. Cristina Bignardi

Correlatore: Prof. Giuseppe Perale

Candidato: Andrea Ficerai

Ottobre 2018

Indice

Riassunto	I
Abstract	III
1 Introduzione	1
1.1 Pratica clinica per l'inserimento di impianti in campo orale	1
1.2 Ossa del massiccio facciale	2
1.3 Sostituti ossei	4
1.3.1 Osso autologo	4
1.3.2 Allograft	5
1.3.3 Xenograft	6
1.3.4 Materiali sintetici	6
1.4 Tecniche chirurgiche	8
1.4.1 Sinus lift	8
1.4.2 Guided Bone Regeneration	11
1.5 SmartBone® come sostituto osseo	16
1.5.1 Composizione e caratteristiche fisico-chimiche	16
1.5.2 Meccanismo di azione di SmartBone®	17
1.5.3 Applicazioni SmartBone® in campo orale	18
1.6 Metodi di valutazione dei sostituti ossei	19
1.7 Scopo del lavoro	22

2	Materiali e Metodi	24
2.1	Costruzione del database clinico	24
2.1.1	Raccolta dati clinici	24
2.1.2	Analisi dati clinici	27
2.1.3	Analisi statistica dei dati per valutare la presenza di bias.....	28
2.2	Costruzione del database istologico	29
2.2.1	Analisi istologiche	30
2.2.2	Digitalizzazione istologie	33
2.2.3	Analisi istomorfometrica	34
2.3	Metanalisi	38
3	Risultati e Discussione	39
3.1	Risultati clinici	39
3.1.1	Valutazione della validità del campione ed esclusione di bias.....	46
3.2	Risultati istologici	54
3.3	Confronto tra dati di analisi clinica ed istologica.....	61
3.4	Metanalisi	61
4	Conclusioni	64
	Bibliografia	66

Indice figure

Figura 1: Ossa del cranio	2
Figura 2: Sistema di numerazione dentale ISO	3
Figura 3: Innesto osseo sinusale con approccio laterale e posizionamento simultaneo di due impianti.....	9
Figura 4: Tecnica di Summer	10
Figura 5: Horizontal augmentation con tecnica GBR e innesto a blocco	12
Figura 6: Trattamento di peri-implantite con tecnica GBR	13
Figura 7: Socket preservation.....	14
Figura 8: Trattamento del difetto paradontale.....	15
Figura 9: Diverse forme e dimensioni di SmartBone®	16
Figura 10: Immagini istologiche dell'impianto di SmartBone®	18
Figura 11: Glissando™ Slide Scanner.....	33
Figura 12: Acquisizione immagine istologica con scanner Glissando™	34
Figura 13: Immagine istologica importata all'interno del software ImageJ	35
Figura 14: Treshold.....	36
Figura 15: Selezione delle regioni	37
Figura 16: Distribuzione dell'età dei pazienti del database clinico.....	47
Figura 17: Boxplot delle età della popolazione maschile e femminile	47
Figura 18: Database clinico- distribuzione età della popolazione di sesso maschile.....	48
Figura 19: Database clinico- distribuzione età della popolazione di sesso femminile	49
Figura 20: Verifica della presenza di bias in relazione al genere (A), abitudine al fumo (B), disturbi metabolici (C) e utilizzo di membrane (D)	50
Figura 21: Analisi istomorfometrica che mostra le percentuali medie di osso nuovo (NB), SmartBone® (SB), tessuto connettivo (CT) e altri tessuti (Others) nelle biopsie prelevate rispettivamente a 4-5 (A), 6-7 (B), 8-9 (C) mesi dopo l'intervento di Sinus Lift	56
Figura 22: Analisi istomorfometrica che mostra le percentuali medie di osso nuovo (NB), SmartBone® (SB), tessuto connettivo (CT) e altri tessuti (Others) nelle biopsie prelevate rispettivamente a 4-5 (A), 6-7 (B), 8-9 (C) mesi dopo l'intervento di GBR.....	58

Figura 23: Analisi istomorfometrica che mostra le percentuali medie di osso nuovo (NB), SmartBone® (SB), tessuto connettivo (CT) e altri tessuti (Others) nelle biopsie prelevate rispettivamente a 4-5 (A), 6-7 (B), 8-9 (C) mesi dopo l'intervento di Sinus Lift e GBR 60

Indice tabelle

Tabella 1: Valutazione clinica dei casi	41
Tabella 2: Risultati clinici dei materiali utilizzati per gli interventi di Sinus Lift	42
Tabella 3: Risultati degli interventi di Sinus Lift	43
Tabella 4: Risultati clinici dei materiali utilizzati per gli interventi di GBR.....	44
Tabella 5: Risultati degli interventi con tecnica GBR	45
Tabella 6: Risultati complessivi degli interventi.....	45
Tabella 7: Percentuali di successo dei materiali usati per pazienti di sesso maschile e femminile.....	51
Tabella 8: Percentuali di successo dei materiali usati per pazienti non fumatori e fumatori	52
Tabella 9: Percentuali di successo dei materiali usati per pazienti senza e con disturbi metabolici	53
Tabella 10: Percentuali di successo dei materiali usati con o senza l' utilizzo di membrane	53
Tabella 11: Percentuali di successo di SmartBone® e degli altri materiali presenti in letteratura usati per procedure di Sinus Lift e tecniche GBR.....	63

Riassunto

Il trattamento di pazienti edentuli con l'inserimento di impianti dentali e la rigenerazione guidata dei tessuti ossei attorno alla regione implantare sono tecniche comuni e largamente impiegate nella pratica clinica attuale. La buona riuscita delle procedure di impianto e il mantenimento della stabilità a lungo termine dipendono dalla qualità e dalla quantità di tessuto osseo disponibile. Con la perdita dei denti, causata da patologie o traumi, l'osso alveolare non svolge più la sua funzione, inizia a riassorbirsi e, in assenza di volume osseo appropriato, è necessario intervenire con procedure chirurgiche.

Una varietà di tecniche di incremento osseo, dipendenti dalla posizione e dalla dimensione del difetto, è stata introdotta per fornire il supporto necessario per il posizionamento degli impianti. In generale, in questi interventi, l'osso autogeno è utilizzato come materiale di riferimento. Tuttavia, il recente sviluppo di nuovi materiali di innesto di diversa origine come alloinnesti, xenotrapianti, e materiali alloplastici ha fornito delle valide alternative. Questi materiali di ultima generazione, di origine naturale, sintetica o composita, vengono impiantati nel sito di interesse e permettono la colonizzazione del sostitutivo osseo da parte delle cellule e quindi la rigenerazione dell'osso del paziente.

In questo lavoro di tesi, si è preso in esame il materiale commerciale SmartBone®: sostituto osseo di origine bovina a cui sono stati aggiunti polimeri biodegradabili e frammenti di collagene che espongono la sequenza amminoacidica RGD. Questi componenti combinati insieme permettono una veloce e efficiente colonizzazione cellulare che ha come conseguenza una buona osteointegrazione, grazie al meccanismo naturale del rimodellamento osseo. Nello specifico è stato condotto uno studio retrospettivo al fine di valutare "safety and performance" del materiale quando utilizzato nel campo della chirurgia ricostruttiva orale, confrontandolo con i diversi materiali disponibili sul mercato e noti nella pratica clinica corrente. Lo studio comparativo è stato condotto utilizzando differenti sostituti ossei di diversa origine, utilizzati per il trattamento di 267 pazienti,

sottoposti a procedure di ricostruzione e rigenerazione ossea al fine di ottenere la fissazione dell'impianto o preservare il tessuto osseo circostante.

Per supportare ulteriormente le indicazioni cliniche, nell'ambito della vigilanza del mercato, di fondamentale importanza per garantire la sicurezza e la qualità del prodotto, è stato effettuato uno studio osservazionale su casi clinici standard registrati e relativi all'uso di SmartBone® in applicazioni dentali da parte di operatori privati in tutta Italia. In particolare, lo studio ha visto la raccolta di 28 biopsie dai siti innestati e l'analisi istologica dei campioni per mettere in evidenza il meccanismo d'azione di SmartBone®.

Complessivamente, i risultati clinici ed istologici permettono di affermare che SmartBone® presenta caratteristiche osteoconduttive e osteoinduttive, guidando la crescita riparativa dell'osso naturale e incoraggiando le cellule indifferenziate a diventare osteoblasti attivi: mediamente, la survival rate degli impianti è superiore al 90% e a 6 mesi dall'intervento si riscontra una percentuale di nuovo osso del 60%. Inoltre, l'assenza di cellule infiammatorie conferma la biocompatibilità e la non immunogenicità di SmartBone® che viene riassorbito e sostituito completamente da osso maturo nel giro di pochi mesi.

Abstract

The treatment of edentulous patients with insertion of dental implants and guided regeneration of bone tissue around the implant region are common techniques and widely used in current clinical practice. The success of the implant procedures and the maintenance of long-term stability depend on the quality and quantity of available bone tissue. With the loss of teeth, caused by pathologies or traumas, the alveolar bone no longer performs its function, begins to reabsorb and, in the absence of appropriate bone volume, it is necessary to intervene with surgical procedures.

A variety of bone augmentation techniques, depending on the location and size of the defect, have been introduced to provide the support needed for implant placement. In general, autogenous bone is used as reference material in these interventions. However, the recent development of new graft materials of different origins such as allograft, xenografts, and alloplastic materials has provided viable alternatives. These materials of the latest generation, of natural, synthetic or composite origin, are implanted in the site of interest and allow the colonization of the substitutive bone by the cells and then the regeneration of the patient's bone.

In this thesis work, the SmartBone® commercial material was examined: bone substitute of bovine origin reinforced with biodegradable polymers and collagen fragments exposing the RGD amino acid sequence. These combined components allow a fast and efficient cell colonization which results in good osteointegration, thanks to the natural mechanism of bone remodeling. Specifically, a retrospective study was carried out to evaluate safety and performance of the material when used in the field of oral reconstructive surgery, comparing it with the different materials available on the market and known in current clinical practice. The comparative study was conducted using different bone substitutes of different origins, used for the treatment of 267 patients, who underwent bone reconstruction and regeneration procedures in order to obtain fixation of the implant or preserve the surrounding bone tissue.

To further support clinical claims, in the field of market surveillance, important to guarantee the safety and quality of the product, an observational study was carried out on registered clinical cases related to the use of SmartBone® in dental applications from private operators throughout Italy. In particular, the study included the collection of 28 biopsies from the grafted sites and the histological analysis of the samples to highlight the mechanism of action of SmartBone®.

Overall, the clinical and histological results allow to state that SmartBone® has osteoconductive and osteoinductive characteristics, guiding the reparative growth of natural bone and encouraging undifferentiated cells to become active osteoblasts: on average, the implant survival rate is greater than 90% and after 6 months there is 60% of new bone. Furthermore, the absence of inflammatory cells confirms the biocompatibility and non-immunogenicity of SmartBone®, which is reabsorbed and completely replaced by mature bone within a few months.

1 Introduzione

1.1 Pratica clinica per l'inserimento di impianti in campo orale

L'utilizzo di impianti dentali è una pratica clinica molto comune nei casi in cui, a seguito di patologie o traumi, si verifica la perdita dei denti in un paziente. In queste situazioni l'osso alveolare della mandibola e della mascella non svolge più la sua funzione ed inizia a riassorbirsi. Di conseguenza è necessario inserire un impianto al posto dei denti mancanti per riprodurre l'anatomia del dente all'interno della cavità alveolare, contrastare l'atrofia ossea ed evitare il riassorbimento. Se trascorrono anni prima del posizionamento dell'impianto, l'osso si riduce sia in altezza che in spessore e non è più possibile l'inserimento diretto dato che la sua stabilità primaria dipende dalla quantità e dalla qualità dell'osso residuo. Tale condizione spesso può essere risolta solo con un intervento chirurgico, mirato alla ricostruzione o rigenerazione dell'osso mancante in misura tale da permettere un successivo impianto. In questo senso, i biomateriali svolgono un ruolo chiave nella riparazione e rigenerazione ossea.

Difatti, la maggior parte delle tecniche moderne di chirurgia orale utilizzano innesti ossei, di origine sintetica o naturale, che favoriscono la ricrescita ossea e permettono la rigenerazione guidata dei tessuti attorno agli impianti [1].

L'innesto consiste quindi nell'inserimento di materiale in zone che presentano deficit ossei. Solo quando risulta perfettamente integrato con il tessuto autoctono del paziente è possibile procedere con l'impianto dentale. La durata di questa fase dipende, oltre che da molti fattori specifici, anche dalle caratteristiche proprie del materiale di cui è composto. In questo senso, requisiti essenziali sono la resistenza meccanica e l'elevata porosità con strutture interconnesse che conferiscono al materiale proprietà osteoconduttive [2]. Inoltre, il biomateriale deve presentare un'elevata affinità per le cellule al fine di promuoverne la differenziazione con conseguente formazione di nuovo osso. Difatti, le cellule autoctone del paziente modellano il sostituto e lo incorporano al tessuto osseo [3].

1.2 Ossa del massiccio facciale

Il massiccio facciale, o splancnocranio (Figura 1), è costituito da 14 ossa che formano il viso e quindi le cavità nasali, orbitali e orali. Queste ossa sono: 2 lacrimali che formano la parte interna dell'orbita, 2 ossa nasali che delimitano l'apertura del naso, 2 turbine nasali, 2 ossa palatine che formano la parte posteriore del palato, 2 ossa che formano la mascella, 2 ossa zigomatiche che formano le guance, l'osso vomere che separa le narici e infine la mandibola che, al contrario delle altre ossa, può muoversi liberamente [4].

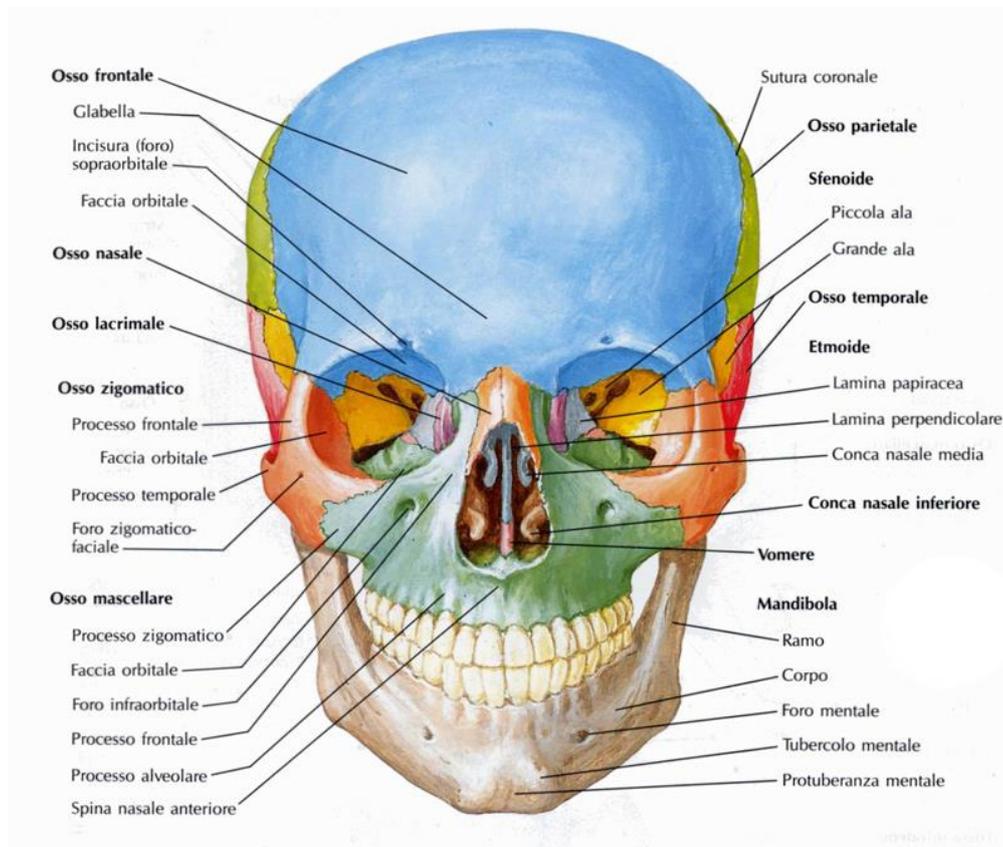


Figura 1: Ossa del cranio [5]

Nello specifico, l'osso mascellare concorre alla formazione del pavimento delle fosse nasali, della volta della cavità boccale e del pavimento della cavità orbitaria. È costituito dal corpo, dal quale si staccano alcune sporgenze, dette processi del mascellare e nel suo interno racchiude la cavità del seno mascellare [6]. La mandibola, invece, è un osso impari e mediano e forma lo scheletro della parte inferiore della faccia. All'interno della bocca, la

mascella dà impianto ai denti dell'arcata superiore e la mandibola ai denti dell'arcata inferiore.

L'osso della mascella e della mandibola è formato da una parte basale e da una parte alveolare che ospita la radice del dente [7]. L'osso alveolare, la gengiva, il cemento radicolare e il legamento paradontale costituiscono il parodonto.

L'osso che ricopre l'alveolo è un tessuto corticale mineralizzato che differisce in molti aspetti da altri tessuti ossei del nostro corpo: grazie all'azione cellulare di osteoclasti e osteoblasti, è in continuo e costante rimodellamento ed inoltre svolge un ruolo molto importante in quanto mantiene saldo il dente nella cavità ossea e risponde alle sollecitazioni alle quali il dente è sottoposto.

La perdita dei denti, conseguente a traumi o a patologie di diversa natura, causa il riassorbimento dell'osso alveolare e la graduale perdita delle sue funzioni primarie [8]. Le cause principali del riassorbimento osseo sono l'estrazione o la perdita di denti, la parodontite, la gengivite, le erosioni mucose, traumi, osteoporosi e invecchiamento.

La bocca ospita complessivamente 32 denti, 16 nell'arcata superiore e 16 nell'arcata inferiore. Le due arcate possono essere divise da un piano sagittale che permette di individuare quattro quadranti, ciascuno contenente 8 denti come mostrato in Figura 2.

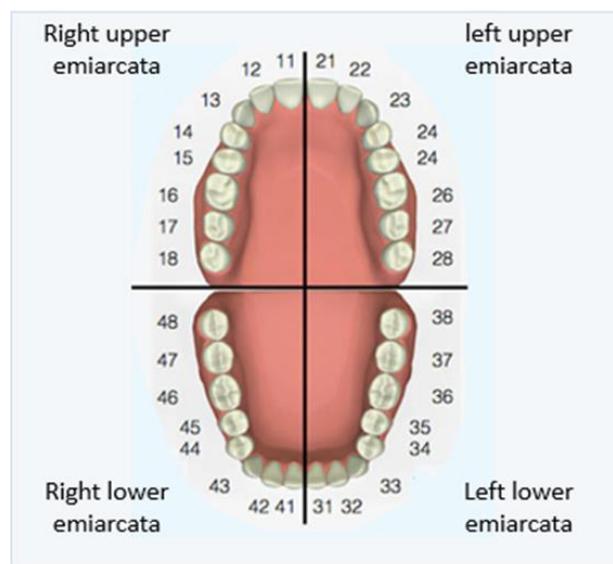


Figura 2: Sistema di numerazione dentale ISO [9]

Ciascun dente è identificato da una numerazione specifica (il sistema ISO) che utilizza un codice di due cifre, la prima delle quali indica il quadrante e la seconda la posizione dell'elemento dentario cominciando a numerare a livello della linea mediana del volto [10]. Questa numerazione è la stessa utilizzata in questo lavoro per individuare i diversi siti specifici.

1.3 Sostituti ossei

I sostituti ossei sono materiali che vengono impiantati in un distretto anatomico specifico. L'innesto osseo viene colonizzato dalle cellule del tessuto in cui è impiantato e viene successivamente integrato al fine di svolgere le funzioni biologiche del tessuto osseo [11].

Devono avere requisiti di base per poter svolgere la loro funzione:

- devono possedere proprietà osteoinduttive e stimolare quindi la produzione di nuovo tessuto osseo, attivando le cellule mesenchimali attraverso la presenza di proteine bioattive e fattore di crescita;
- devono essere osteoconduttivi, cioè devono facilitare e stimolare la creazione di vasi sanguigni e canali di Havers;
- devono garantire una struttura adeguata in grado di sostenere e assorbire i carichi;
- devono avere dei pori interconnessi per assicurare la migrazione e la proliferazione cellulare [2].

Per gli innesti ossei, i materiali possono avere origine naturale o sintetica. Gli innesti di origine naturale più utilizzati comprendono osso autologo, osso omologo e osso eterologo.

1.3.1 Osso autologo

L'osso autologo, prelevato dallo stesso individuo ricevente, è considerato il riferimento per tutti gli altri materiali da innesto sia per l'elevato potenziale osteogenico, grazie alla presenza nella porzione midollare di fattori di crescita e di cellule staminali totipotenti, sia per le eccellenti proprietà osteoinduttive e osteoconduttive. Non si riscontrano problemi

di compatibilità immunologica, poiché l'organismo riconosce l'impianto come "self" e può essere ottenuto a basso costo in quanto il suo prelievo richiede solo materiale chirurgico e terapeutico [12].

Le zone di prelievo possono essere distinte in intraorali (sinfisi, ramo mandibolare, tuber maxillae, selle edentule, processo zigomatico, spina nasale, esostosi) ed extra-orali (cresta iliaca, calvaria, tibia) [13].

L'utilizzo di osso autologo come materiale da innesto ha comunque diversi svantaggi in quanto allunga la procedura chirurgica e comporta spesso dolore residuo e danni estetici. La procedura di prelievo non può essere applicata in pazienti anziani, troppo giovani e in caso di malattie tumorali e inoltre il materiale può fallire nella pratica clinica se gli elementi cellulari non sopravvivono nell'impianto.

In aggiunta, l'utilizzo dell'osso autologo può causare complicazioni come ematomi, perdite di sangue, ferite ai nervi, formazione di ernie, lesioni alle arterie, fratture, difetti estetici, trapianto di tumori e, talvolta, disagi cronici del sito donatore, con incidenze stimabili tra l'8,5 e il 20% dei casi.

1.3.2 Allograft

L'osso omologo rappresenta una valida alternativa all'osso autogeno essendo prelevato da individui della stessa specie del ricevente. Il trapianto osseo può essere effettuato sia in donatori viventi, per esempio da teste di femore asportate durante gli interventi di protesi d'anca, sia da cadaveri e deve essere conservato nelle banche dell'osso dopo opportuno trattamento [12].

L'alloinnesto risulta osteoconduttivo e debolmente osteoinduttivo se sono ancora presenti i fattori di crescita in seguito alla modalità di elaborazione [3]. Inoltre, il materiale richiede in molti casi la sterilizzazione e questo processo ha effetti dannosi sulle proprietà meccaniche e può causare la disattivazione delle proteine normalmente presenti nell'osso sano.

Gli alloinnesti hanno sollevato in passato preoccupazioni sui potenziali rischi infettivi, ma le attuali procedure di prelievo e di trattamento del materiale hanno limitato in maniera significativa la possibile trasmissione di agenti patogeni.

I limiti di tali trapianti sono i costi relativi alle procedure laboriose di raccolta e lavorazione del tessuto, la scarsa resistenza meccanica, l'osteoaduzione limitata e il rischio, seppur remoto, di infezione [3].

1.3.3 Xenograft

L'osso eterologo proviene da specie diverse da quella dell'individuo ricevente e può essere di origine bovina, equina o porcina.

La provenienza da una specie diversa amplifica i problemi immunitari e le tecniche di preparazione devono prevedere la sistematica distruzione delle proteine attraverso procedimenti chimici o trattamenti termici.

Gli innesti eterologhi presentano dei vantaggi rispetto all'osso autologo, come la grande disponibilità di materiale, che li rende adatti anche per difetti di grosse dimensioni e la minor invasività per il paziente che non deve subire un ulteriore intervento in altre zone del corpo per il prelievo di tessuto osseo, con tempi di guarigione ridotti e senza invalidità residue [12].

Inoltre, il materiale presenta buone proprietà meccaniche, una buona osteoconduttività, un utilizzo relativamente semplice e basso costo [3].

Gli svantaggi che presenta questo tipo di innesto sono rappresentati dal rischio di infezioni nel sito di impianto, dalla eliminazione tramite lisi da parte dell'organismo prima di sostituirli con nuovo osso ed infine dalla possibilità di trasmissione di agenti patogeni e di sensibilizzazione dell'ospite alle proteine del donatore [12].

1.3.4 Materiali sintetici

I biomateriali alloplastici sono sostituti sintetici con spiccate caratteristiche di osteoconduttività, sono indicati per ogni tipo di innesto, non presentano rischi di reazioni

immunitarie o da corpo estraneo, garantiscono brevi periodi di recupero, sono privi di tossicità sistemica o locale, sono facilmente sterilizzabili e reperibili in commercio [12]. I materiali sul mercato sono divisi in 4 gruppi: fosfati di calcio, solfati di calcio, biovetri e polimeri.

Tra questi i fosfati di calcio (idrossiapatite-HA e il β -fosfato tricalcico- β TCP) sono quelli più utilizzati grazie alla loro composizione che ricorda la fase inorganica dell'osso. Secondo quanto riportato in letteratura, l'HA è considerata osteoconduttiva e non riassorbibile, il TCP presenta proprietà osteoconduttive, e si riassorbe velocemente. Esistono per questo motivo materiali che presentano combinazioni di HA e TCP (fosfati di calcio bifasici) per beneficiare della capacità riempitive dell'idrossiapatite e delle proprietà di riassorbibilità del TCP. Anche se i fosfati di calcio sono considerati in generale osteoconduttivi, devono ancora essere individuate le caratteristiche superficiali ottimali per raggiungere un'osteoconduttività pari a quella dell'osso umano [13].

Il solfato di calcio presenta un'ottima biocompatibilità, è facilmente modellabile e viene utilizzato sia come barriera per la rigenerazione ossea guidata, sia come vettore per proteine morfogenetiche. Tuttavia, il rapido riassorbimento e la friabilità costituiscono un limite nell'impiego di questo materiale nelle tecniche di rigenerazione ossea per difetti molto estesi [14].

I biovetri sono materiali a base di silice, altamente biocompatibili ed osteoconduttivi che stabiliscono con l'osso un legame chimico-fisico attraverso un film di Ca-P. Sono assolutamente non riassorbibili, non riuscendo gli osteoclasti ad eliminare i materiali a base di silicati, e permangono sotto forma di materia vetrosa estremamente solida, trovando quindi indicazione in tutti quei casi in cui la richiesta sia quella di una buona stabilità strutturale e integrazione con il sito ricevente [12]. Anche se vengono impiegati sia in procedure di GBR sia in interventi di rialzo del seno mascellare, per la loro natura granulare e non porosa non hanno le stesse capacità di rivascolarizzazione e riempitive degli altri materiali.

I copolimeri di acido polilattico e poliglicolico sono prodotti di sintesi, altamente biocompatibili, non inducono reazioni immunologiche o infiammatorie, sono dotati di

capacità osteoconduttive e sono completamente sostituiti da osso trabecolare. Tra i materiali sostitutivi sintetici, sono quelli che presentano un più rapido riassorbimento che in genere avviene nel giro di 60-90 giorni [13]. Questi polimeri, nonostante la loro elevata biocompatibilità, devono ancora essere compiutamente studiati, anche se non vengono riportate controindicazioni degne di nota.

1.4 Tecniche chirurgiche

1.4.1 Sinus lift

Il Sinus Lift è una procedura chirurgica che ha lo scopo di aumentare la quantità di osso nella zona posteriore della mascella nell'area dei premolari e molari tramite il sollevamento della membrana di Schneider e l'inserimento di materiale da innesto che mira a promuovere la formazione di nuovo osso.

La perdita di osso nella regione supero-posteriore risulta più evidente rispetto ad altre regioni della mascella [15] e questo riassorbimento può essere causato da malattie paradontali o dall'assenza dei denti. È quindi necessario garantire una quantità sufficiente di osso per il posizionamento degli impianti dentali.

Le tecniche utilizzate per eseguire questa procedura possono essere diverse e permettono un diverso approccio al problema clinico.

1.4.1.1 Maxi sinus lift

La tecnica del Maxi Sinus Lift permette un accesso laterale tramite un'osteotomia di forma quadrata o circolare nella zona mascellare posteriore attraverso la quale avviene l'inserimento del sostituto osseo.

Prima dell'intervento è necessario sottoporre il paziente ad un esame radiografico/TC affinché il chirurgo possa valutare l'anatomia e l'altezza dell'osso residuo.

Viene effettuata una disinfezione del sito chirurgico e dei tessuti periorali e si anestetizza localmente la zona di intervento. Prima di incidere l'osso si esegue un'incisione crestale,

un'incisione di rilascio verticale nell'area canina e un'incisione verticale distale nella seconda o terza area molare, in modo da consentire il sollevamento di un lembo a tutto spessore per esporre la parete antero-laterale dell'osso mascellare. Successivamente si procede all'apertura della finestra laterale tramite l'utilizzo di frese a bassa velocità o con tecnica piezoelettrica con abbondante irrigazione salina sterile, per ottenere l'accesso al seno mascellare [16].

La membrana di Schneider, che separa il seno mascellare dall'osso, viene accuratamente sollevata dal pavimento e dalle pareti anterolaterale e mediale del seno tramite l'utilizzo di scollatori curvi. I granuli del materiale per l'innesto osseo vengono quindi inseriti all'interno della finestra e vanno a riempire il seno mascellare (Figura 3). In base all'entità di incremento osseo da ottenere, si possono utilizzare chips o granuli di materiali diversi. La quantità di sostituto osseo utilizzato può variare, ma vengono in genere aggiunti diversi millimetri di materiale all'interno del seno.



Figura 3: Innesto osseo sinusale con approccio laterale e posizionamento simultaneo di due impianti [16]

La finestra ossea laterale può essere poi ricoperta da una membrana di collagene riassorbibile o di pericardio bovino e il lembo viene poi richiuso e suturato.

Gli impianti vengono inseriti dai 4 ai 9 mesi dopo, per consentire una buona rigenerazione ossea. Prima di posizionare gli impianti è necessario effettuare una valutazione clinica specifica mediante radiografia/TC. Possono essere posizionati in alcuni casi direttamente durante l'intervento di incremento osseo, ma è necessario avere un sufficiente spessore residuo dell'osso corticale nel pavimento del seno mascellare per avere una buona stabilità primaria.

1.4.1.2 Tecnica di Summer

Se il fenomeno della pneumatizzazione (presenza di aria all'interno del seno mascellare) è molto accentuato, e la cresta residua è inferiore a 5 mm o se il seno è molto ampio in senso trasversale la tecnica di elezione utilizzata è il grande rialzo di seno mascellare con accesso laterale. Nel caso invece in cui la cavità sinusale è ridotta in senso trasversale e con almeno 5-8 mm di cresta residua si può utilizzare la tecnica del piccolo rialzo del seno per via crestale con contemporaneo o dilazionato inserimento degli impianti [17].

Tale metodica è stata proposta per primo da Tatum nel 1986 e successivamente Summers, nel 1994, ha definito un protocollo ben preciso che prevede l'utilizzo di osteotomi dedicati e l'inserimento di riempitivo.

La tecnica di Summer, nota anche come piccolo rialzo del seno mascellare, utilizza particolari strumenti manuali e meccanici atti al sollevamento del pavimento del seno mascellare e della membrana stessa che lo riveste, tramite approccio crestale (Figura 4).

Dopo una valutazione clinica specifica e la preparazione del campo operatorio si esegue un'anestesia locale e si incide la mucosa del mascellare superiore tramite bisturi. Una volta misurata l'altezza ossea disponibile, si pratica l'osteotomia con appositi strumenti meccanici e le relative frese munite di stop di diversa lunghezza, così da rimanere 2-3 mm al di sotto del pavimento osseo. Tramite l'utilizzo di osteotomi, muniti anch'essi di stop, e martelletto chirurgico si assestano dei colpi che portano alla frattura della corticale del pavimento mascellare con conseguente sollevamento della membrana Schneideriana.

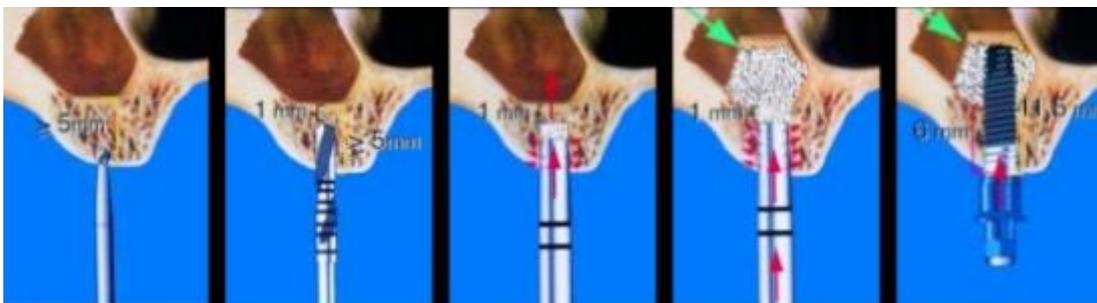


Figura 4: Tecnica di Summer [18]

Il nuovo spazio che si viene a creare tra il pavimento e la membrana viene riempito con sostituti ossei o collagene. L'impianto può essere inserito nella stessa seduta operatoria.

Dopo l'intervento, si eseguono radiografie endorali per documentare l'entità del rialzo e per monitorare la stabilità dell'impianto.

1.4.1.3 Minimal invasive sinus elevation

La Minimal Invasive Sinus Elevation (MISE) è sicuramente meno invasiva dal punto di vista chirurgico rispetto al Sinus Lift con approccio laterale e permette di ottenere un aumento osseo, se necessario, anche oltre i 10 mm.

Questa tecnica permette di rialzare in modo atraumatico il seno mascellare, attraverso il piegamento della corticale del pavimento del seno e il superamento della sua fase di deformazione elastica sino a rottura, al fine di inserire il biomateriale e l'impianto.

Un grande vantaggio rispetto alla tecnica di Summer è l'utilizzo di frese che, grazie all'uso di stop di profondità, consentono un sollevamento graduale, 1 mm per volta, della membrana di Schneider, preservandola integralmente e minimizzando il disagio per il paziente [19].

Tale procedura garantisce un'ottima percentuale di successo.

1.4.2 Guided Bone Regeneration

La rigenerazione ossea guidata (GBR) è una tecnica chirurgica che prevede l'uso di membrane in associazione con materiali di riempimento per ricreare un'adeguata rigenerazione del tessuto osseo mancante al fine di inserire poi gli impianti in un volume adeguato o per ripristinare i tessuti che circondano la superficie dell'impianto.

Questa tecnica viene utilizzata nella pratica clinica per il trattamento di peri-implantiti, difetti paradontali e trattamenti di socket preservation ed inoltre viene effettuata per ottenere incrementi orizzontali o verticali della cresta alveolare.

1.4.2.1 Vertical and horizontal augmentation

In alcuni casi, atrofie ossee, malattie parodontali o esiti di traumi possono portare a un insufficiente volume osseo con l'impossibilità di inserimento di impianti, compromettendo il risultato estetico-funzionale della riabilitazione protesica. In presenza di questi difetti sono necessarie avanzate tecniche di ricostruzione [20].

L'intervento chirurgico, come mostrato in Figura 5, inizia con un'incisione lungo tutta l'estensione del difetto, associata, se necessario, a due incisioni di rilasciamento vestibolari anch'esse a spessore totale al fine di ottenere la miglior visibilità dell'area e si procede quindi allo scollamento del lembo.

Il materiale di innesto può essere sotto forma di granuli o, se il difetto è molto grande, è possibile utilizzare blocchi fissati con viti, riempiendo poi gli spazi con chips ossee. La zona del difetto viene poi rivestita da una membrana riassorbibile e viene infine suturato il lembo.

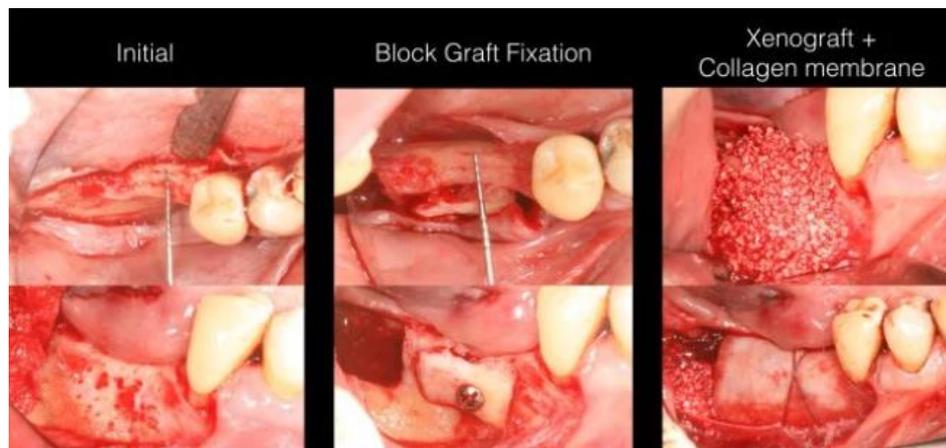


Figura 5: Horizontal augmentation con tecnica GBR e innesto a blocco [21]

Durante l'intervento di GBR, sia orizzontale che verticale, nei casi in cui il difetto permetta un'adeguata stabilità primaria degli impianti, si può procedere all'inserimento simultaneo di essi; nei casi in cui l'atrofia è più accentuata si esegue la sola procedura rigenerativa e gli impianti vengono inseriti a rigenerazione ossea avvenuta [22].

1.4.2.2 Peri-implant defects

La peri-implantite è una condizione infettiva che interessa i tessuti molli e duri intorno agli impianti osteointegrati con conseguenti reazioni infiammatorie e perdita di osso di supporto [23].

La placca batterica in genere è responsabile della peri-implantite e di conseguenza il trattamento deve comprendere in primo luogo misure anti-infettive come la somministrazione sistemica di antibiotici per ridurre l'infiammazione [24].

Se gli approcci terapeutici non chirurgici non riescono da soli a promuovere la re-osteointegrazione, si può ricorrere a interventi chirurgici per minimizzare il rischio di reinfezione della tasca peri-implantare. In particolare, la soluzione che ad oggi presenta il miglior risultato per il trattamento delle peri-implantiti è la tecnica GBR (Guided Bone Regeneration) con innesto osseo e membrana, come descritto in letteratura [25].

Dopo aver effettuato il lembo chirurgico e la decontaminazione batterica della superficie dell'impianto [26], si inserisce il materiale di innesto sotto forma di chips o granuli, si ricopre il sito con una membrana riassorbibile e si sutura il lembo (Figura 6).



Figura 6: Trattamento di peri-implantite con tecnica GBR [27]

1.4.2.3 Socket preservation

A causa di carie, traumi o stadi avanzati di malattia paradontale molti denti vengono estratti senza particolare riguardo per il mantenimento del volume della cresta alveolare che subisce cambiamenti morfologici e diminuzioni in altezza e in spessore. Questi

cambiamenti possono risultare clinicamente significativi e se il riassorbimento risulta evidente diventa difficile il posizionamento dell'implanto.

A tal scopo, la tecnica di socket preservation permette di minimizzare il riassorbimento della cresta residua e rende possibile il posizionamento dell'implanto con conseguente soddisfacimento di criteri funzionali ed estetici [28].

Gli ultimi progressi riguardo i materiali e le tecniche di innesto osseo hanno consentito il posizionamento degli impianti in siti che in passato risultavano compromessi, permettendo un restauro protesico degli elementi dentali persi.

La tecnica di conservazione della cavità può variare a seconda del caso, ma vi sono delle procedure comuni. Il primo passo è eseguire l'estrazione del dente compromesso in maniera atraumatica, senza danni per l'osso che circonda la radice e successivamente viene effettuata nell'alveolo una toilette chirurgica di tutti i tessuti infiammatori per evitare eventuali complicazioni post estrattive. Una volta rimossa la radice viene scelto e inserito il materiale da innesto in formato di chips o microchips.

Quando si parla di innesto, una delle problematiche principali che compromettono il risultato della tecnica di socket preservation è il fatto che l'invaginazione epiteliale del sito innestato è più pronunciata rispetto al processo che porta all'integrazione ossea [29].



Figura 7: Socket preservation [30]

Il materiale innestato ha quindi bisogno di essere protetto dalla crescita epiteliale e si utilizza una membrana che ricopre l'innesto e crea uno spazio protetto di integrazione e rigenerazione ossea separato dall'ambiente in cui le cellule riparano il tessuto gengivale. Il tutto è infine suturato per stabilizzare i materiali (Figura 7).

Sono necessari 4-6 mesi affinché il sito innestato venga completamente sostituito dall'osso del paziente e si può poi procedere con il posizionamento dell'impianto.

1.4.2.4 Periodontal defects

La paradontite è una patologia infiammatoria ad eziologia batterica che porta alla degradazione dei tessuti che assicurano sostegno e stabilità ai denti, provocando la perdita di attacco connettivale e il riassorbimento dell'osso alveolare [31].

Per ristabilire e mantenere funzionalità ed estetica sono stati sviluppati diversi approcci terapeutici in relazione allo stadio della patologia.



Figura 8: *Trattamento del difetto paradontale [32]*

Prima di procedere con la terapia rigenerativa, è di fondamentale importanza la terapia antibatterica al fine di produrre una buona risposta dei tessuti, eliminando le infezioni e alleviando l'infiammazione. Se la terapia non è sufficiente a contrastare la perdita ossea, si procede con la terapia chirurgica rigenerativa [33][34].

Le tecniche chirurgiche solitamente utilizzate sono GBR e GTR, che prevedono l'utilizzo di sostituti ossei osteoconduttivi e membrane [35]. Questa tecniche sono utilizzabili se c'è almeno una parete rimanente.

Dopo la terapia antinfettiva, si procede con il sollevamento del lembo mucoperiosteale e il difetto paradontale viene riempito con l'innesto osseo. L'area incrementata viene poi

coperta con una membrana, in genere riassorbibile, per ridurre il riassorbimento osseo e prevenire la contaminazione batterica (Figura 8) [36]. Il lembo viene riposizionato e suturato per scaricare la tensione ed ottenere una chiusura primaria del sito di intervento.

1.5 SmartBone® come sostituto osseo



Figura 9: Diverse forme e dimensioni di SmartBone® [9]

SmartBone® è un materiale composito costituito da matrice bovina rinforzata con polimeri bioattivi riassorbibili, e viene utilizzato come sostituto osseo per supportare la colonizzazione cellulare e la rigenerazione dell'osso. Dopo aver ottenuto il marchio CE è stato introdotto nel mercato internazionale come dispositivo medico di classe III nel 2012 dalle Industrie Biomediche Insubri S.A. (IBI-SA, Mezzovico, Svizzera). Grazie alle sue caratteristiche è possibile ottenere scaffold di forme e dimensioni specifiche per il singolo paziente (Figura 9), largamente utilizzati nella chirurgia orale e maxillofacciale, ma anche nella chirurgia ortopedica.

1.5.1 Composizione e caratteristiche fisico-chimiche

Lo SmartBone® è costituito da una matrice di osso spongioso bovino decellularizzato, rinforzato con copolimero di acido polilattico (PLA) e policaprolattone (PCL), a cui vengono aggiunte frammenti di collagene che espongono la sequenza amminoacidica RGD. L'osso bovino è una matrice minerale fatta di calcio, idrossiapatite (HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e residui di collagene che presenta una composizione chimica e una morfologia simili a quelle dell'osso umano.

La sola matrice bovina, tuttavia, risulta essere rigida e troppo fragile. I trattamenti di decellularizzazione e sterilizzazione, inoltre, distruggono la struttura biochimica, non permettendo l'adesione cellulare. Di conseguenza la struttura della matrice viene rinforzata con un componente elasto-plastica, attraverso un coating polimerico. È stato dimostrato come il rivestimento di PLA-PCL, scelto in quanto polimero biorisorbibile e già largamente utilizzato in applicazioni medicali, conferisce alla struttura maggiore resistenza meccanica. Inoltre, l'aggiunta di polisaccaridi, anche in piccole dosi, rende il sostituto osseo più idrofilico, aumentando quindi l'affinità con il sangue e favorendo l'adesione cellulare.

In particolare, la porosità e la dimensione dei pori sono confrontabili con l'osso umano e quindi adatti alla migrazione cellulare. Il tempo di completa degradazione della componente polimerica avviene tra il quinto e il sesto mese dall'impianto, tempo corrispondente all'effettivo tempo di integrazione ossea [37].

1.5.2 Meccanismo di azione di SmartBone®

In Figura 10 viene mostrata un'immagine istologica dello SmartBone® impiantato e del tessuto circostante. Si può notare che la crescita di nuovo tessuto osseo all'interno del graft (freccia nera), è evidenziata dalla presenza di osteociti dentro la lacuna (freccia gialla). Sono presenti formazioni di osso lamellare maturo e osteoblasti che generano nuovo tessuto osseo (frecce verdi). Ad un ingrandimento superiore, si notano le linee di ricrescita dell'osso, di colore violaceo. Il graft di SmartBone® (frecce nere) viene progressivamente sostituito dal nuovo tessuto osseo (frecce verdi). Gli osteoblasti sono presenti sia nello stato attivo che in quello quiescente, quando dopo aver formato osso maturo (frecce gialle) si trasformano in osteociti [9].

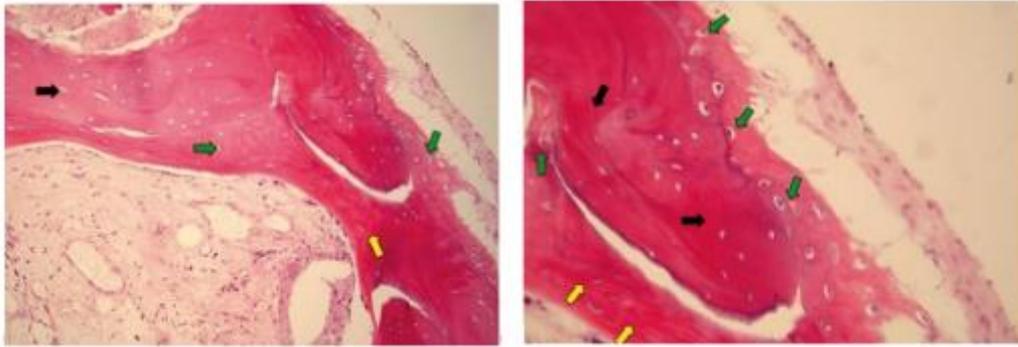


Figura 10: Immagini istologiche dell'impianto di SmartBone® [38]

1.5.3 Applicazioni SmartBone® in campo orale

In letteratura sono stati condotti molti studi sull'utilizzo di SmartBone® per il trattamento di difetti ossei in campo orale.

Un primo studio ha riguardato il trattamento di pazienti sottoposti ad interventi chirurgici per il recupero di volume osseo a scopo implantare, con l'utilizzo di SmartBone® in formato di granuli e blocchi opportunamente dimensionati [39]. Il materiale è risultato essere facilmente lavorabile e modellabile al fine di ottenere la forma e la grandezza necessarie per adattarsi allo specifico difetto osseo dei pazienti. Inoltre, la resistenza meccanica dell'innesto ha permesso il fissaggio all'osso ricevente tramite l'utilizzo di viti da osteosintesi. Già 4 mesi dopo l'intervento, è risultata visibile la formazione di nuovo osso e una buona osteointegrazione che hanno permesso il posizionamento sicuro degli impianti. Non si sono verificate complicazioni post-operatorie né in seguito all'intervento di incremento osseo né in seguito al posizionamento degli impianti. Il follow-up a 3 anni ha mostrato una morfologia e una struttura ossea comparabili con i siti sani controlaterali.

SmartBone® è stato utilizzato anche per il trattamento di un difetto osseo dovuto al fallimento di un impianto in posizione 44 [40]. L'impianto è stato quindi rimosso e sostituito tramite tecnica GBR eseguita con SmartBone® e membrana collagene riassorbibile. Il follow-up ad un anno ha evidenziato una buona stabilità ossea.

In uno studio condotto nel 2015 da Zollino et al. [41], SmartBone® è stato utilizzato in formato di microchips per procedure di sinus lift con posizionamento immediato

dell'impianto. Il materiale è stato innestato con successo all'interno del seno e le sue proprietà meccaniche hanno permesso il posizionamento immediato della vite di impianto, ricoperta con una membrana collagene riassorbibile. La radiografia a 4 mesi dall'intervento ha mostrato una buona osteointegrazione dell'innesto e una buona ricrescita ossea, non è stata rilevata la presenza di tessuti fibrotici, infiammazioni o reazioni indesiderate, confermando la buona compatibilità del materiale. Dopo 8 mesi, si può osservare che il nuovo osso formato ha densità confrontabile con quella dell'osso sano del paziente.

1.6 Metodi di valutazione dei sostituti ossei

Come descritto nel paragrafo 1.3, esistono al giorno d'oggi numerose opzioni per il trattamento delle perdite di matrice ossea e l'impiego di innesti è diventato comune nella pratica clinica. È stato quindi necessario trovare metodi di valutazione per capire se il prodotto garantisce o meno risultati soddisfacenti.

Durante i follow-up clinici a seguito dell'intervento, si fanno analisi di tipo quantitativo e qualitativo per studiare rispettivamente quanto osso neo formato si trova nella zona di innesto e che qualità ossea possiede. Questo permette di capire se il nuovo materiale ha consentito la guarigione del difetto e se l'osso appena formato è comparabile con i tessuti circostanti. A questo si aggiungono spesso volte valutazioni di tipo istologico e densitometrico dei dati in possesso.

L'istologia è una disciplina scientifica che studia la struttura microscopica e ultramicroscopica dei tessuti e degli organi animali e vegetali, dal punto di vista morfologico, istochimico e delle attività funzionali da essi esplicate. Per i sostituti ossei in campo orale, gli esami istologici vengono eseguiti qualche mese dopo l'innesto, prelevando solitamente il campione da analizzare nel momento in cui si prepara il distretto anatomico per l'impianto. Ciò che interessa verificare è che il biomateriale sia perfettamente integrato e che venga progressivamente sostituito da nuovo osso.

Per avere conferma della crescita di nuovo osso favorita dal biomateriale si accerta la presenza di linee di accrescimento e di lamelle ossee che formano l'osteone. Inoltre, l'osso

maturato deve contenere gli osteociti all'interno delle lacune e presentare strati di osteoblasti interposti tra il materiale innestato e il tessuto in accrescimento, come indice di una buona osteoconduttività. Infine, il tessuto connettivo che si forma tra osso e innesto deve risultare ben strutturato e presentare vasi sanguigni per il nutrimento dell'osso in accrescimento [42].

Gli esami istologici, sono molto indicativi della situazione del sito in cui è stato effettuato l'innesto, ma risultano invasivi in quanto è necessario asportare un campione di osso per seguire poi le analisi e ciò non sempre è possibile.

Oltre all'analisi qualitativa, attraverso l'esame istologico è possibile effettuare misure quantitative tramite l'analisi istomorfometrica. L'analisi istomorfometrica, utilizzata all'interno di questo lavoro di tesi, è uno strumento supportato da software per l'analisi quantitativa dei campioni istologici che permette di conoscere il livello di formazione di nuovo osso rispetto al riassorbimento dell'innesto e permette il confronto tra campioni [43]. Questo tipo di analisi si basa sulla misura di lunghezze, perimetri e aree e viene eseguita su immagini 2D.

Le misure che si ottengono sono rappresentazioni bidimensionali delle istologie e questo rappresenta una limitazione. È possibile tuttavia eseguire delle misurazioni su fette diverse del campione in modo da ottenere dei parametri che permettono di avere una rappresentazione tridimensionale della struttura ossea in termini volumetrici [42].

È possibile, inoltre, verificare se sta avvenendo o meno il fenomeno di osteogenesi confrontando la densità minerale dell'osso nel sito di impianto con quella dell'osso sano e misurando l'altezza ossea nel tempo, effettuando esami prima dell'innesto e ripetendoli poi a diversi mesi dall'intervento. Le tecniche densitometriche più diffuse utilizzano l'attenuazione dei raggi X nell'attraversare il distretto scheletrico da esaminare. Le modalità di trasmissione di tali tecniche sono basate sull'assorbimento e l'interazione con il tessuto osseo dei fotoni incidenti. Le tecniche proiettive come la DXA (dual energy X-ray absorptiometry) o la SXA (single energy X-ray absorptiometry) si basano tutte sulla rappresentazione bidimensionale della struttura ossea esaminata, quindi le differenti regioni esaminate vengono rappresentate su un piano frontale con il risultato di ottenere

una misura integrata che comprende osso spongioso, osso compatto ed eventuali formazioni calciche delle parti molli [44].

È stata condotta all'interno di questo lavoro di tesi una valutazione semi quantitativa delle immagini radiografiche (RX endorali, OPT). Analizzando gli esami radiografici pre e post operatori, è stato possibile per ogni caso clinico valutare il livello di ricrescita e la densità ossea delle zone sottoposte ad interventi di ricostruzione e rigenerazione ed è stato quindi assegnato il relativo livello di 'Outcome evaluation'. I casi nei quali non è stato possibile l'inserimento dell'impianto o è stata necessaria la sua rimozione a causa di complicazioni di diversa natura sono stati catalogati come 'Failures'.

Un'altra tecnica usata per valutare la densità minerale ossea nella pratica clinica è la Tomografia Quantitativa Computerizzata (QTC). È una tecnica non invasiva che misura la densità del tessuto osseo all'interno di un volume specifico, senza la sovrapposizione di altri tessuti [45]. Quest'ultimo metodo di valutazione non è stato utilizzato all'interno del lavoro di tesi.

In seguito all'immissione di un dispositivo medico sul mercato, il follow-up post marketing¹ permette di monitorare "safety and performance" del prodotto. Con il termine "safety" si intende il rispetto dei requisiti di sicurezza mentre le "performance" rappresentano invece il meccanismo di azione e le prestazioni del materiale in termini di capacità di rigenerazione ossea.

Dato che i dispositivi medici sono approvati sulla base di studi clinici che coinvolgono un numero relativamente piccolo di persone, la sorveglianza post marketing può confermare o negare le proprietà del dispositivo quando usato per una popolazione molto grande di pazienti con condizioni cliniche differenti.

¹ La sorveglianza post marketing (PMS) è la pratica del monitoraggio della sicurezza di un farmaco o di un dispositivo medico dopo che è stata immessa sul mercato ed è una parte importante della scienza della farmacovigilanza. Poiché farmaci e dispositivi medici sono approvati sulla base di studi clinici che coinvolgono un numero relativamente piccolo di persone, la sorveglianza post marketing può perfezionare ulteriormente, o confermare o negare, la sicurezza di un farmaco o di un dispositivo dopo che è stato usato nella popolazione generale da un gran numero di persone che hanno una vasta gamma di condizioni cliniche [59].

A tale scopo, in letteratura e soprattutto in ambito clinico sono stati condotti molti studi che hanno visto l'utilizzo di Revisioni Sistematiche. Una Revisione Sistemica (RS) è uno strumento di ricerca scientifica che ha l'obiettivo di riassumere dati provenienti da strumenti di ricerca primari, ad esempio con una revisione esaustiva della letteratura relativa a un dato argomento, per individuare, evidenziare e valutare tutte le fonti pertinenti a una specifica questione scientifica [46]. Al fine di confrontare i diversi studi viene usata in maniera diffusa la metanalisi. La metanalisi è una tecnica clinico-statistica quantitativa che permette di combinare e confrontare i dati dei diversi studi generando un unico dato conclusivo per rispondere a uno specifico quesito clinico.

Per confrontare, e quindi validare, i risultati ottenuti con SmartBone® nello studio clinico eseguito in questo lavoro di tesi è stata utilizzata la metanalisi statistica: le percentuali di successo ottenute dal materiale all'interno del presente studio sono state confrontate con le percentuali di successo riportate da altri materiali e dal materiale di riferimento (osso autogeno) all'interno di studi presenti in letteratura.

1.7 Scopo del lavoro

Lo scopo del presente lavoro di tesi è valutare "safety and performance" di SmartBone® nel campo della chirurgia ricostruttiva orale, confrontandolo con i diversi materiali disponibili sul mercato e noti nella pratica clinica corrente tramite la metanalisi. Questo è stato effettuato tramite una valutazione clinica ed un'analisi istologica di biopsie relative a casi standard registrati in applicazioni dentali con l'utilizzo di SmartBone® da parte di operatori privati in tutta Italia.

I due dataset, il primo clinico, relativo a 267 casi di chirurgia ricostruttiva orale con l'utilizzo di diversi materiali tra cui SmartBone®, ed il secondo, istologico, contenente dati relativi a 28 campioni prelevati dopo alcuni mesi dagli interventi, esclusivamente effettuati con SmartBone®, sono stati confrontati per ottenere una sovrapposizione significativa dei risultati e una maggiore evidenza clinica.

Complessivamente, i risultati clinici ed istologici permettono di affermare che SmartBone® presenta caratteristiche osteoconduttive e osteoinduttive, guidando la crescita riparativa dell'osso naturale e incoraggiando le cellule indifferenziate a diventare osteoblasti attivi: mediamente, la survival rate degli impianti è superiore al 90% e a 6 mesi dall'intervento si riscontra una percentuale di nuovo osso del 60%.

2 Materiali e Metodi

2.1 Costruzione del database clinico

2.1.1 Raccolta dati clinici

La prima parte del lavoro è stata svolta presso gli Studi Odontoiatrici Associati a Ponsacco (PI) in collaborazione con il Dr. Giorgio Carusi, laureato in Medicina e Chirurgia all'Università di Bologna e specializzato in Odontostomatologia a Pisa.

Il medico ha fornito le cartelle cliniche dei pazienti che si sono dimostrati disponibili al trattamento dei propri dati a scopi scientifici tramite firma del consenso informato.

La popolazione consiste in pazienti adulti (≥ 18 anni) che necessitano di sottoporsi a procedure di ricostruzione e rigenerazione ossea per il posizionamento di impianti o per preservare i tessuti circostanti l'impianto.

I casi sono stati raccolti secondo i seguenti Inclusion/Exclusion Criteria.

Inclusion Criteria:

- Età compresa tra 18 e 86 anni;
- La necessità di sottoporsi ad un inserimento/restauro di impianto;
- Nessuna formazione di neoplasie durante i precedenti 10 anni.

Exclusion Criteria:

- Età inferiore a 18 anni e superiore a 86 anni;
- Osteopatie, malattie immunodepressive;
- Gravidanza o allattamento;
- Dipendenza e consumo di droghe;

- Consumatori abituali di alcool;
- Forti fumatori.

I casi clinici sono stati in primo luogo anonimizzati attribuendo ad ogni pazienti un '*Codice Soggetto*' di carattere alfa-numerico: all'interno del documento '*Riferimento codice soggetto*' è stato riportato l'anno di nascita dei pazienti con il codice identificativo a loro assegnato e tale documento è stato lasciato all'interno dello studio odontoiatrico, in piena disponibilità del clinico.

Le cartelle sono state analizzate e sono stati trascritti i dati di interesse all'interno dei '*Case Report Form*' (CRF).

Il protocollo clinico richiede la raccolta dei seguenti dettagli per ogni singolo paziente:

- dati preclinici e anamnesi attuale;
- descrizione dettagliata del caso, compresi gli obiettivi;
- immagini radiografiche pre-chirurgiche e fotografie dei siti di intervento, se disponibili;
- report chirurgico, compresa la descrizione dettagliata del protocollo chirurgico, i materiali utilizzati e le foto, se disponibili;
- report del follow-up post-chirurgico;
- follow-up 9 settimane dopo l'intervento, immagini a raggi X e fotografie del sito in cui è stato effettuato l'intervento, se disponibili;
- follow-up 2-7 mesi dopo l'intervento chirurgico in sede di inserimento dell'impianto, immagini a raggi X e fotografie del sito in cui è stato effettuato l'intervento, se disponibili;
- follow-up a lungo termine (> 1 anno, meglio se fino a 2 anni) immagini a raggi X e fotografie del sito in cui è stato effettuato l'intervento, se disponibile.

È stata evidenziata la presenza di TC, CBCT o allegati di altra natura e infine sono state riportate eventuali annotazioni come ad esempio date di anamnesi molto antecedenti o

successive all'intervento, estrazioni nelle zone limitrofe al sito di intervento, label informations relative alle viti di impianto e, in caso di insuccesso, le cause di fallimento degli impianti.

Per ciascun intervento chirurgico sono stati individuati i materiali utilizzati per gli innesti che sono stati classificati in 4 categorie:

- Autografts
- Allografts
- Xenografts
- Synthetic materials

SmartBone® è stato indicato come classe a sé, in modo da essere più facilmente confrontabile con le altre tipologie di innesto.

Dopo la raccolta dei dati clinici, questi sono stati organizzati in un foglio Excel attraverso la creazione di una tabella. Per ogni caso clinico sono indicati:

- Subject Code;
- Gender (M o F);
- Age;
- Health Status;
- Clinical Need;
- Material;
- Therapeutical Approach (Microchips, Chips, Granules, Blocks, Gel);
- Clinical Follow-up (pre-surgery post-surgery, 2-7 months after surgery, >1 after surgery)

Infine, è stata indicata la presenza o meno di eventuali campioni istologici prelevati in seguito all'intervento dal sito nel quale è stato effettuato l'innesto.

2.1.2 Analisi dati clinici

Dopo aver costruito la tabella come descritto nel paragrafo precedente, si è passati all'analisi dei dati clinici.

Il primo passo è stato quello di fissare degli intervalli di '*Outcome evaluation*' da assegnare ai diversi casi. Sono state create 5 fasce che hanno permesso di attribuire ad ogni caso clinico il livello percentuale di riassorbimento osseo.

I 5 intervalli sono stati definiti nel seguente modo:

- Optimal (>80%)
- Good (50-80%)
- Medium (30-50%)
- Poor (<30%)
- None (0%)

'*Optimal*' sta ad indicare che più dell'80% del materiale innestato è ancora presente nel sito di impianto, garantendo ottima densità e ottima ricrescita ossea; '*None*' indica che il materiale non è più presente e non ha quindi garantito le sue performance in termini di osteoconduttività.

I casi clinici nei quali non è stato possibile l'inserimento dell'impianto o è stata necessaria la sua rimozione immediata a causa di complicazioni di diversa natura sono stati catalogati come '*Failures*'.

Analizzando gli esami radiografici pre e post operatori è stato possibile verificare l'osteogenesi confrontando la densità minerale dell'osso nel sito di impianto con quella dell'osso sano e misurando la ricrescita ossea nel tempo, come descritto nel paragrafo 1.6 del capitolo precedente.

È stato quindi possibile per ogni caso valutare il livello di ricrescita e la densità ossea delle zone sottoposte ad interventi di ricostruzione e rigenerazione ed è stato quindi assegnato il relativo livello di '*Outcome evaluation*'.

I diversi livelli di 'Outcome Evaluation' sono stati classificati come segue:

- 'None', 'Poor' e 'Medium' sono stati indicati come 'Unsatisfactory'
- 'Good' 'Optimal' indicati come 'Satisfactory'

In seguito a questa valutazione, per ciascun paziente è stata riportata, dove possibile, la condizione di:

- Fumatore;
- Presenza di disturbi metabolici;
- Utilizzo di membrana per la procedura chirurgica.

A questo punto il database clinico è stato interrogato in Excel tramite l'utilizzo di filtri e Pivot tables che hanno permesso di ottenere una migliore visualizzazione dei dati in base alle informazioni di interesse.

2.1.3 Analisi statistica dei dati per valutare la presenza di bias

Al fine di verificare l'assenza di bias o di correlazioni nascoste all'interno del database clinico è stata effettuata un'analisi statistica.

Nello specifico si è verificato che la distribuzione delle età della popolazione seguisse una distribuzione normale e che allo stesso modo le popolazioni divise in base al genere, M e F, fossero sovrapponibili e seguissero anch'esse un andamento normale.

Per le distribuzioni normali sono stati calcolati gli indici di forma Skewness e Kurtosis.

La Skewness è un termine statistico che indica l'assenza di specularità di una distribuzione rispetto a qualsiasi asse verticale. Rispetto alla curva normale ($Skewness = 0$), è possibile affermare se una distribuzione presenta asimmetria se ha una coda più lunga: nello specifico, se la coda più lunga è a sinistra la distribuzione presenta asimmetria negativa ($Skewness < 0$), se, al contrario, la coda più lunga è a destra allora la distribuzione presenta asimmetria positiva ($Skewness > 0$).

La Kurtosis fa invece riferimento alla maggiore o minore gibbosità di una curva in prossimità del suo massimo, quindi alla minore o maggiore lunghezza delle code. Rispetto ad una curva normale, detta anche mesocurtica ($Kurtosis = 0$), è possibile avere curve leptocurtiche o ipernormali se presentano una distribuzione più alta al centro e più bassa ai lati ($Kurtosis > 0$) e curve platicurtiche più basse al centro e più alte ai lati ($Kurtosis < 0$) [47].

Oltre al calcolo degli indici di forma è stato utilizzato il test di Student a due code per fare il confronto tra le medie dei campioni dei pazienti di sesso maschile e femminile: l'ipotesi nulla del test è stata che le età delle due popolazioni fossero mediamente uguali (differenza tra le medie pari a 0) con un livello di confidenza del 95% (α livello di significatività pari a 0,05) [48].

Infine, l'assegnazione dei diversi livelli di outcome riportata nel paragrafo precedente ('Unsatisfactory' e 'Satisfactory') è stata applicata per dimostrare che le performance cliniche dei diversi materiali e in primo luogo di SmartBone® non fossero dipendenti dal genere dei pazienti, da disturbi metabolici o da abitudini al fumo e dalla presenza o meno di membrane, utilizzate durante la procedura chirurgica.

Tutte le operazioni indicate in questo paragrafo sono state eseguite con Microsoft Excel.

2.2 Costruzione del database istologico

Nell'ambito del follow-up post-marketing, IBI ha implementato dal 2013 uno studio osservazionale volto a registrare casi clinici standard relativi all'uso di SmartBone® in applicazioni dentali da parte di operatori privati in tutta Italia. Lo studio ha visto la raccolta di biopsie dai siti innestati e le successive analisi istologiche per supportare ulteriormente le affermazioni cliniche e il meccanismo d'azione di SmartBone®.

Oltre alla raccolta dei dati clinici relativi a pazienti sottoposti ad interventi effettuati da un solo chirurgo con l'utilizzo di una vasta gamma di materiali, è stato utile ai fini del lavoro prelevare e raccogliere campioni istologici da pazienti sottoposti però a procedure chirurgiche svolte da medici diversi e con l'utilizzo di SmartBone®.

Le 28 biopsie sono state prelevate da pazienti sottoposti a tecniche diverse di ricostruzione ossea nel campo della chirurgia orale e i tempi di prelievo variano tra i 4 e i 9 mesi.

Anche per l'analisi istologica sono stati registrati i consensi informati dei pazienti e la raccolta dei campioni è stata resa anonima, attribuendo un codice a ciascuna biopsia.

2.2.1 Analisi istologiche

Le biopsie sono state prelevate ed inviate al laboratorio Otolab, situato all'interno dell'azienda ospedaliero-universitaria pisana di Cisanello (PI) e l'analisi dei campioni è stata eseguita in collaborazione con il Dr. Delfo D'Alessandro e la Dott.ssa Serena Danti dell'Università di Pisa.

2.2.1.1 Preparazione dei campioni

Dopo la raccolta, le biopsie sono state fissate per una notte a 4 °C in una soluzione tamponata neutra contenente formalina al 4% (p/v) (Bio-Optica, Milano, Italia), quindi sono state lavate in una soluzione acquosa di tampone fosfato (PBS 1X, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e incubate per 15 giorni a 4 °C in una soluzione decalcificante contenente Acido etilendiamminotetracetico (EDTA, Sigma-Aldrich) al 10% diluito in acqua distillata (ddH₂O), rinnovando la soluzione ogni 3-4 giorni.

Dopo i lavaggi, i campioni sono stati conservati in etanolo al 70% a 4 °C, disidratati con soluzioni acquose di etanolo a concentrazione crescente fino ad arrivare all'etanolo assoluto (Sigma-Aldrich) e chiarificati due volte per 45 minuti in xilolo (Sigma-Aldrich). Tutte le fasi sono state eseguite in un bagno termostato alla temperatura di 40 °C; le biopsie sono state infine incubate per 2 ore a 60 °C in paraffina liquida e infine incluse in paraffina.

I blocchetti paraffinati sono stati sezionati a 5 micron mediante microtomo rotativo standard, e le sezioni ottenute sono state montate su vetrini e conservate in stufa a 37 °C. Prima di ogni colorazione e reazione immunohistochimica, le sezioni sono state sparaffinate in xilolo e reidratate in etanolo assoluto.

2.2.1.2 Colorazione con Ematossilina-eosina (H&E)

La colorazione con ematossilina-eosina è stata eseguita per valutare la morfologia generale dei campioni. Le sezioni sono state incubate per 5 minuti in ematossilina (Sigma-Aldrich) e lavate per 5 minuti in acqua di fonte per rivelare la colorazione, quindi sono state incubate per 1 minuto in eosina (Sigma-Aldrich), e, dopo lavaggio in ddH₂O, disidratate in etanolo assoluto; le sezioni sono state poi chiarificate in xilolo e montate con il mezzo DPX (Sigma-Aldrich).

2.2.1.3 Colorazione per reazione dell'acido periodico con il reattivo di Schiff (PAS)

La reazione PAS è stata effettuata per evidenziare la presenza di glicoproteine, visibili in magenta. I campioni sono stati incubati per 10 minuti con una soluzione di acido periodico (Sigma-Aldrich) all'1% in ddH₂O e le sezioni sono state asciugate all'aria. Successivamente, sono state incubate per 15 minuti nel reattivo di Schiff (Sigma-Aldrich) e lavate in acqua di fonte per 10 minuti per rivelare la reazione. La contro-colorazione è stata eseguita incubando i campioni in ematossilina come descritto precedentemente. Le sezioni sono state quindi disidratate e montate come descritto in precedenza.

2.2.1.4 Colorazione con Alcian Blue a pH 2,5

La colorazione con Alcian Blue a pH 2,5 è stata effettuata per evidenziare la presenza di glicosamminoglicani (GAG) acidi generici, visibili in ciano. La colorazione è stata eseguita con un kit specifico, secondo le istruzioni del produttore (04-161802, Bio-Optica). La contro colorazione è stata eseguita incubando i campioni per 5 minuti con una soluzione acquosa contenente lo 0,1% di nuclear fast red (Sigma-Aldrich) e il 5% di solfato di alluminio (Sigma-Aldrich) e la reazione è stata rivelata effettuando un lavaggio di 5 minuti con acqua di fonte. Le sezioni sono state quindi disidratate e montate come descritto in precedenza.

2.2.1.5 Colorazione tricromica di Van Gieson

La colorazione di Van Gieson è stata effettuata per evidenziare la presenza di grandi fasci di fibre collagene nei campioni di osso analizzati. La colorazione mostra in rosso-porpora le fibre collagene, in giallo il resto dei tessuti e in marrone-nero i nuclei cellulari.

Le sezioni sono state prima contro-colorate con ematossilina come descritto in precedenza, quindi sono state incubate per 2 minuti con l'1% di fucsina acida (Sigma-Aldrich) diluita al 10% in soluzione satura di acido picrico (Sigma-Aldrich). Dopo lavaggio in ddH₂O, le sezioni sono state disidratate e montate.

2.2.1.6 Reazione Immunoistochimica

Le sezioni sono state incubate per 20 minuti al buio con una soluzione di metanolo (Sigma-Aldrich) contenente lo 0,6% di H₂O₂ al fine di bloccare le perossidasi endogene presenti nei tessuti. I campioni sono stati quindi incubati per 20 minuti a 37 ° C con siero di capra (Vektor Lab, Burlingame, CA, USA) diluito al 5% in PBS 1X, al fine di bloccare i siti aspecifici di legame degli anticorpi secondari.

Le sezioni sono state infine incubate per una notte a 4°C con anticorpi primari diluiti in una soluzione di PBS 1X contenente lo 0,1% di albumina di siero bovino (BSA, Sigma-Aldrich):

- anti-collagene di tipo 1 prodotto nel coniglio e diluito 1: 2000 (ab34710, abCam, Cambridge, MA, USA);
- anti-osteocalcina prodotto nel coniglio e diluito 1: 800 (sc30044, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA);
- anti-TGF-β1 prodotto nel coniglio e diluito 1: 500 (sc-146, Santa Cruz);
- anti-fibronectina prodotto nel topo e diluito 1: 1000 (sc-59826, Santa Cruz).

Controlli negativi sono stati ottenuti incubando due sezioni per ogni biopsia esclusivamente con la soluzione PBS1X/BSA. Dopo ogni fase, sono stati eseguiti lavaggi con PBS 1X.

Il giorno successivo, i campioni sono stati incubati per 60 minuti con anticorpi secondari biotinilati prodotti nella capra e diretti contro topo e coniglio (Vektor Lab) diluiti 1: 200 in una soluzione di PBS 1X contenente 1,5% di siero di capra; i campioni sono stati quindi incubati per 30 minuti con streptavidina secondo le istruzioni del produttore (Vectastain Elite ABC Kit Standard, Vektor Lab) e infine per 5 minuti al buio con il substrato cromogeno diamminobenzidina (0,5 mg/ml 3,3'-diamminobenzidina tetraidrocloruro contenente 0,02% H₂O₂) (Amresco, Solon, OH, USA). Le sezioni sono state infine contro-colorate in

ematossilina, disidratate e montate come descritto in precedenza. Nella seconda parte della reazione, dopo ogni passaggio, sono stati effettuati lavaggi in PBS 1X.

Le sezioni, trattate come descritto sopra, sono state osservate al microscopio ottico e sono state acquisite immagini mediante telecamera collegata allo strumento.

I vetrini sono stati successivamente catalogati e conservati lontano da fonti di luce e calore all'interno di scatole, pronti per essere digitalizzati e analizzati.

2.2.2 Digitalizzazione istologie

Dopo la classificazione, i vetrini sono stati digitalizzati tramite lo scanner Glissando™ della Objective Imaging (Figura 11) che ha permesso di acquisire le immagini istologiche ad altissima risoluzione.



Figura 11: *Glissando™ Slide Scanner* [49]

La prima colorazione di ematossilina-eosina del primo campione è stata posizionata all'interno dello scanner ed è stata effettuata una prima scansione a bassa risoluzione dell'intero vetrino, tramite il comando 'New Scan'.

Sono state poi selezionate manualmente le regioni di interesse una ad una e, cliccando all'interno della regione, lo scanner ha posizionato automaticamente il microscopio al di sopra della sezione da scansionare.

L'immagine risultava sfocata ed è stato quindi necessario metterla a fuoco passando dalla modalità 'Scan View' alla modalità di visualizzazione 'Live View' ed utilizzando il comando 'Autofocus'.

Una volta messa a fuoco l'immagine, si è tornati alla modalità di visualizzazione 'Scan View' ed è stata effettuata la scansione della sezione di interesse attraverso il comando 'Start Scan' (Figura 12).

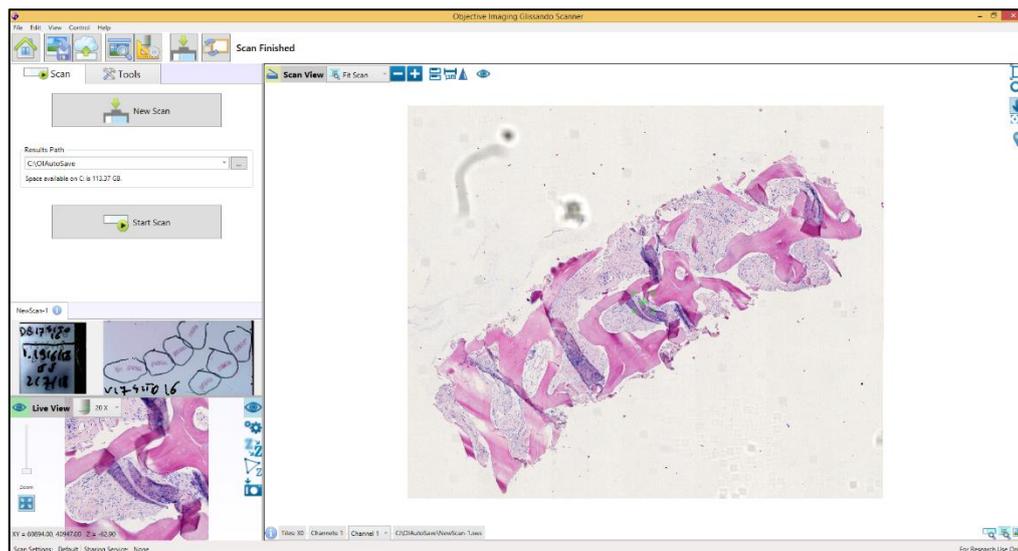


Figura 12: *Acquisizione immagine istologica con scanner Glissando™*

Verificata la qualità dell'immagine, si è passati al salvataggio della stessa riportando il codice della biopsia, il tipo di colorazione o reazione, la posizione all'interno delle scatole e il relativo spot occupato dalla sezione all'interno del vetrino.

Lo stesso procedimento è stato ripetuto per tutti gli spot del vetrino e così anche per tutte le colorazioni e le reazioni immunostochimiche di tutte le biopsie.

2.2.3 Analisi istomorfometrica

Dopo il salvataggio, è stata effettuata l'analisi istomorfometrica delle colorazioni di ematossilina-eosina che meglio descrivono la morfologia generale.

L'analisi istomorfometrica è uno strumento supportato dal software per la valutazione quantitativa di campioni istologici, che consente di ottenere informazioni relative alla

formazione ossea rispetto al riassorbimento dell'innesto e consente di fare confronti tra i campioni [43].

Lo studio è stato condotto misurando per ciascuna biopsia la percentuale di superficie occupata da SmartBone®, nuovo osso, tessuto connettivo e altri tessuti [42].

Le diverse aree delle immagini, sono state selezionate manualmente e analizzate attraverso il software ImageJ (versione 1.50i; <http://imagej.nih.gov>).

Le immagini sono state inizialmente caricate all'interno del software (Figura 13) attraverso i comandi 'File' e 'Open' e come prima cosa è stata calcolata l'area totale della sezione in esame.

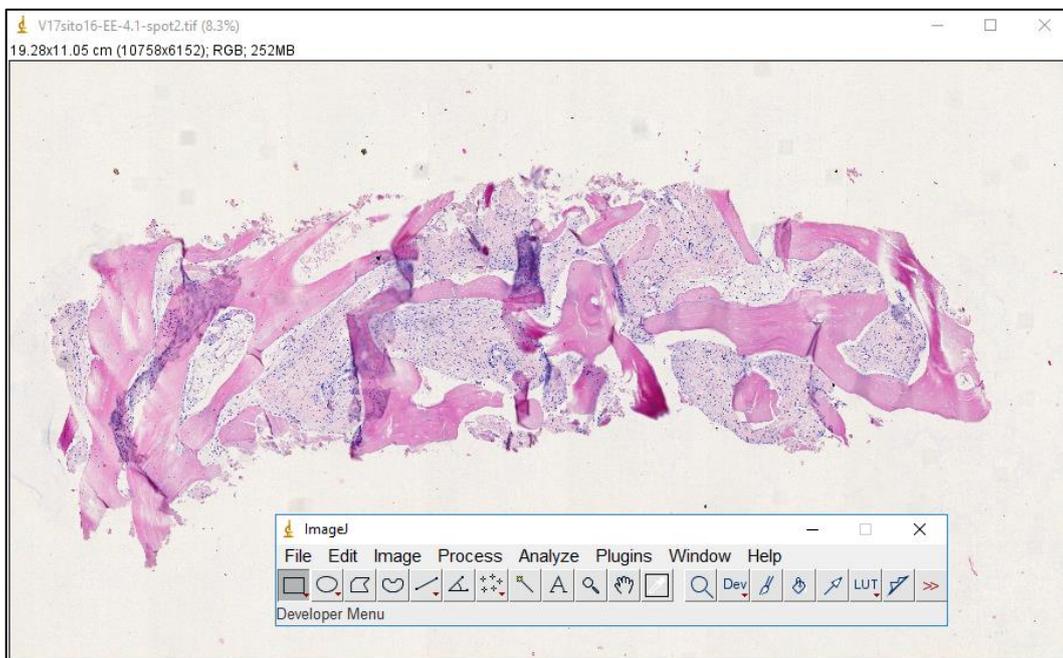


Figura 13: Immagine istologica importata all'interno del software ImageJ

L'immagine, con i comandi 'Image' e 'Type', è stata convertita dal formato 'RGB-color' in formato '8-bit' e successivamente è stato scelto un intervallo di Treshold opportuno per far risaltare la sezione rispetto al fondo bianco dell'immagine con i comandi 'Adjust' e 'Treshold'.

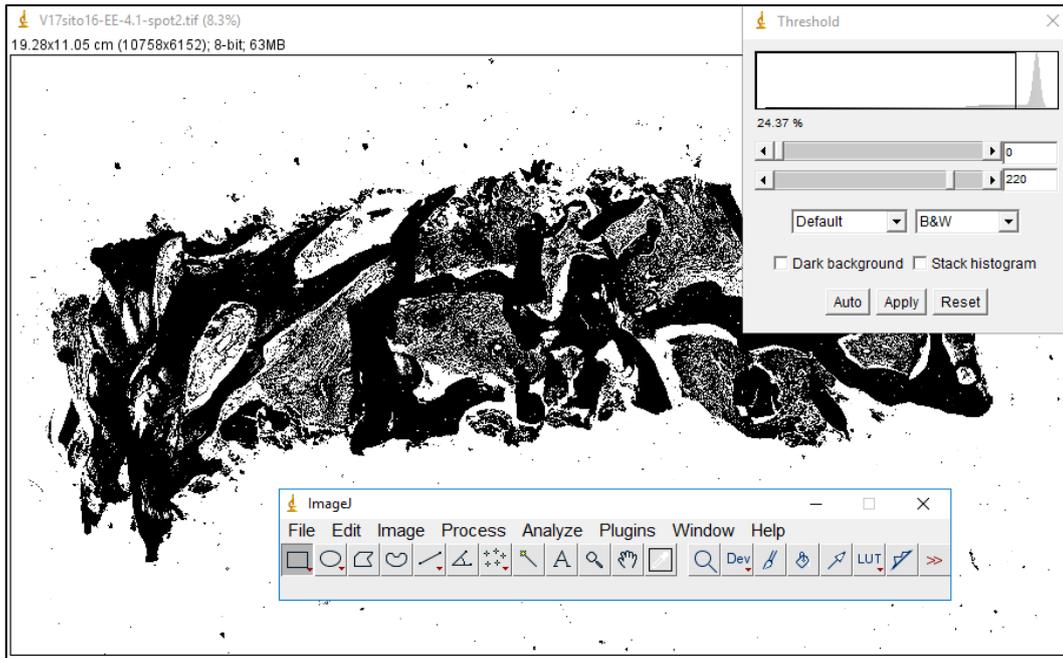


Figura 14: *Threshold*

È stato selezionato per tutte le immagini un intervallo di Threshold che va da 0 ad un valore compreso tra 220 e 230, in base alla qualità della colorazione dell'immagine. Il Threshold ha permesso di convertire l'immagine di partenza in un'immagine 'B&W', colorando in nero la biopsia e lasciando bianco lo sfondo (Figura 14).

A questo punto è stato possibile calcolare l'area della sezione semplicemente usando 'Analyze' e 'Measure'.

Calcolata l'area totale, si è passati alla misura delle differenti aree occupate dai diversi tipi di tessuti: tramite il comando 'Freehand selections' è stato possibile selezionare le regioni relative a SmartBone® (SB), osso nuovo (NB) e tessuto connettivo (CT) mentre con 'Analyze' e 'Measure' è stato possibile calcolare le relative aree (Figura 15).

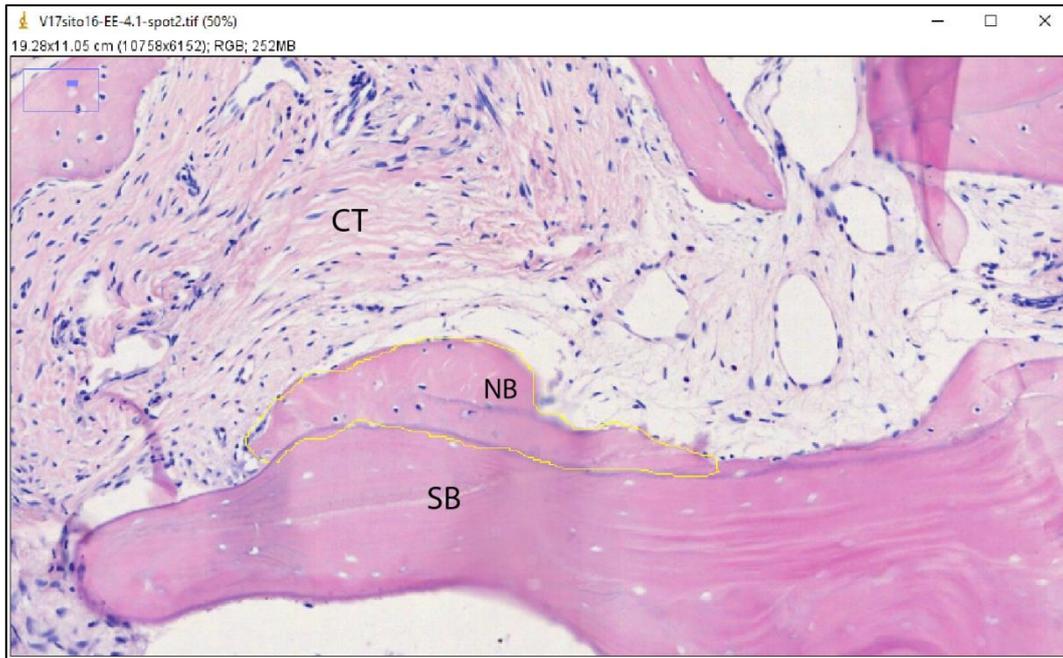


Figura 15: Selezione delle regioni

Altri tipi di tessuti, sotto il nome di 'Others', sono stati calcolati come differenza tra l'area totale e l'area dei tre principali tessuti.

I risultati sono stati riportati in un foglio Excel nel quale è stato possibile ottenere le misure percentuali dei tre tessuti rispetto all'area totale. Per ciascuna biopsia è stata indicata in una tabella Excel anche il codice, la tipologia di intervento e l'intervallo di tempo tra l'innesto e il prelievo.

In breve, grazie all'utilizzo del software, per ciascun campione sono state misurate in pixel le aree dei diversi tessuti e l'area totale della micrografia, quest'ultima sottratta da possibili zone vuote derivate dall'elaborazione istologica, consentendo così di avere le percentuali di SmartBone®, nuovo tessuto osseo, tessuto connettivo e altri tessuti senza la necessità di essere convertiti in unità di barra della scala [42].

Oltre alla misura percentuale delle diverse regioni, il contributo delle particelle di SmartBone® per la nuova formazione ossea è stato valutato usando il Bone-Particle Conductivity Index (BPCi), definito come:

$$BPCi = Lc/Ps$$

Lc è la somma delle linee di contatto tra il tessuto osseo di nuova formazione e SmartBone® e PS è la somma totale dei perimetri delle particelle di SmartBone®. Le misure sono state fatte con il software ImageJ, utilizzando la funzione 'Measure' con lo strumento di selezione 'Freehand line'. Questo indice va da 0, quando non è presente nuovo osso (è presente solo SmartBone®), a un valore indefinito, quando le particelle di SmartBone® sono completamente circondate dai tessuti dell'ospite [42].

Gli indici sono stati calcolati per ciascuna immagine e infine sono stati aggiunti all'interno della tabella Excel.

2.3 Metanalisi

In questo lavoro di tesi, dopo aver creato il database clinico e istologico, come descritto precedentemente, sono state confrontate le due popolazioni in termini di distribuzione di sesso, età e tecniche chirurgiche utilizzate per ottenere una sovrapposizione significativa dei risultati e una maggiore evidenza clinica. Tale confronto è descritto nel paragrafo 3.3.

Per valutare, inoltre, il materiale SmartBone® in termini di "safety and performance" è stato necessario confrontare le percentuali di successo dell'innesto con le percentuali dei diversi materiali utilizzati nella pratica clinica attuale, con maggiore attenzione per l'osso autogeno, materiale di riferimento, e per i competitors.

A tale scopo, sono stati presi in considerazione tre articoli scientifici che hanno riguardato analisi retrospettive di casi clinici di procedure di rigenerazione ossea con l'utilizzo di differenti materiali di innesto e successivo posizionamento degli impianti [50][51][52]. Questi studi sono stati scelti in quanto è presente una corrispondenza con il presente lavoro in termini di esigenze cliniche, procedure chirurgiche e di popolazione di riferimento del mercato. I risultati dei lavori selezionati, inoltre, sono stati esaustivi per il confronto dei survival rate.

I risultati della metanalisi sono riportati al paragrafo 3.4.

3 Risultati e Discussione

3.1 Risultati clinici

Come precedentemente descritto, la popolazione del database clinico è composta da pazienti adulti che necessitano di procedure di ricostruzione e rigenerazione ossea e tale popolazione è formata da 267 pazienti, 111 di sesso maschile e 156 di sesso femminile. Il range di età è tra 34 e 86 anni e l'età media è di 58 ± 11 anni.

Dall'analisi dei casi clinici, i materiali presenti sul mercato ed utilizzati per il trattamento dei pazienti sono stati indicati e raccolti come segue:

- **Autograft**
- **Allografts:**
 - Dembone
 - DynaGraft-D® putty
 - Puros® Allograft
 - Regenafil® Paste
 - Regenaform® Paste
- **Xenografts:**
 - BIO-GEN®
 - Bio-Oss®
 - BioSet™
 - CompactBone® B
 - Copios® cancellous particulate xenograft
 - Osteobiol® Apatos
 - Osteobiol® Putty
 - OSTEOPLANT® OsteOXenon Mix Gel
 - SmartBone®
 - Sterling®

- **Synthetic materials:**
 - Activioss™
 - Alos Blocco
 - Biostite™
 - Calcibon
 - Cerasorb®
 - ENGIpore™
 - Maxresorb® inject
 - NovaBone® Dental Putty
 - Straumann® BoneCeramic®
 - Fortoss® Vital
- **Collagene:**
 - Gingistat

I materiali sopra riportati sono stati utilizzati per interventi di Sinus Lift, trattati con tecniche di Maxi Sinus Lift e MISE (Mini Invasive Sinus Elevation), e per procedure di rigenerazione ossea guidata (GBR).

Sono risultati nel complesso:

- **117 interventi di Sinus Lift:**
 - 25 Maxi Sinus Lift
 - 92 MISE
- **150 interventi di rigenerazione ossea con tecnica GBR:**
 - 85 Vertical and Horizontal augmentation
 - 15 Peri-implant defects
 - 38 Periodontal defects
 - 12 Socket Preservations

Per quanto riguarda i 117 interventi di Sinus Lift, 49 sono stati eseguiti su una popolazione di sesso maschile, con un range di età tra 39 e 82 anni e un'età media di 60 anni, mentre gli altri 68 interventi su una popolazione di sesso femminile, con range di età tra 40 e 80 anni ed età media 59.

Dei 150 pazienti trattati con tecnica GBR, la popolazione maschile è composta da 62 casi con range di età tra 37 e 86 anni ed età media pari a 59 anni. La popolazione femminile è costituita da 88 casi con range di età tra 34 e 82 anni ed età media 54 anni.

Da un punto di vista clinico, 236 sono i casi che presentano livelli di rigenerazione ossea buona o ottima, circa l'88%, non sono state registrate complicazioni o incidenti, ma sono state registrati 8 fallimenti dovuti a deiscenze ossee, infezioni da viti di impianto, volumi degli impianti non adeguati, tensioni dei tessuti molli troppo elevate. 12 sono i casi segnalati con un livello di rigenerazione 'Medium', 7 mostrano un livello 'Poor' e 4 un livello 'None'. La valutazione clinica è riportata in Tabella 1.

Outcome evaluation	Number of cases	%
Optimal	183	68,54%
Good	53	19,85%
Medium	12	4,49%
Poor	7	2,62%
None	4	1,50%
Failures	8	3%
Total cases	267	100%

Tabella 1: Valutazione clinica dei casi

Considerando i materiali usati, per quanto riguarda le 117 procedure di Sinus Lift, l'osso autogeno è stato utilizzato in 10 casi dei quali 6 presentano una rigenerazione ossea 'Optimal', 3 casi una rigenerazione 'Good' e solo un caso una rigenerazione 'Poor'. Lo SmartBone® è stato impiegato in 55 casi con la quasi totalità, 52 casi, che presenta un livello di rigenerazione 'Optimal', 1 caso presenta una rigenerazione 'Good', 1 caso presenta rigenerazione 'Poor' ed è stato riportato un fallimento dovuto a deiscenza ossea. Oltre a SmartBone®, solo 2 sono i casi trattati con Xenografts e presentano una rigenerazione 'Optimal'. I materiali sintetici, usati in 23 casi, hanno garantito una rigenerazione 'Optimal'.

in 17 di questi, una rigenerazione ‘Good’ in 4 casi, una rigenerazione ‘Medium’ in un caso ed è stato registrato un fallimento dovuto al volume dell’impianto non adeguato.

Il collagene è stato utilizzato in 22 casi nei quali non era necessario un rialzo elevato, ma i risultati sono comunque buoni con 20 casi che presentano una rigenerazione ‘Optimal’ e 2 una rigenerazione ‘Good’. 5 interventi di Sinus Lift sono stati eseguiti utilizzando un mix di materiali di diversa origine e, non essendo chiaro in questi casi il meccanismo d’azione all’interno del sito di innesto, non è stato possibile indentificare la classe di appartenenza.

Non sono presenti invece casi di Sinus Lift trattati con Allografts. I risultati sono riportati in Tabella 2.

Materials adopted	Sinus Lift	Outcome evaluation					
		<i>Cases</i>	<i>Optimal</i>	<i>Good</i>	<i>Medium</i>	<i>Poor</i>	<i>None</i>
Autografts	10	6	3	-	1	-	-
Allografts	-	-	-	-	-	-	-
SmartBone®	55	52	1	-	1	-	1
Xenografts	2	2	-	-	-	-	-
Synthetic materials	23	17	4	1	-	-	1

Tabella 2: Risultati clinici dei materiali utilizzati per gli interventi di Sinus Lift

Si evince quindi dai dati che, per i pazienti sottoposti a rialzo del seno mascellare, l’osso autogeno ha una percentuale di successo del 90% e un rate di fallimento pari allo 0%; lo SmartBone® presenta una percentuale di successo pari al 96,36% e l’1,81% di fallimento; i 2 casi trattati con Xenografts riscontrano una percentuale di successo del 100%; i materiali sintetici presentano il 91,30% di successo e il 4,34% di fallimento.

I survival rate sono indicati in Tabella 3.

Materials adopted	Sinus Lift	% Satisfactory	% Failures
Autografts	10	90%	0%
Allografts	-	-	-
SmartBone®	55	96,36%	1,81%
Xenografts	2	100%	0%
Synthetic materials	23	91,30%	4,34%

Tabella 3: Risultati degli interventi di Sinus Lift

Riguardo i 150 pazienti sottoposti ad intervento con tecnica GBR, 35 sono stati trattati con osso autogeno e tra questi 20 presentano una rigenerazione ossea 'Optimal', 11 'Good', 1 paziente ha riportato una rigenerazione 'Medium', 1 una rigenerazione 'Poor' e 1 una rigenerazione 'None'; è stato infine riportato un fallimento dovuto a deiscenza ossea. I casi trattati con Allografts sono 14: 7 risultati 'Optimal', 2 'Good', 3 'Medium' e 2 'Poor'. Gli interventi di GBR trattati con SmartBone® sono 34 e di questi 25 presentano risultati 'Optimal', 5 'Good', 2 'Poor' e 2 casi presentano fallimenti dovuti però ad infezioni provocate dalla vite di impianto e dall'eccessiva tensione dei tessuti molli in seguito all'intervento. I casi trattati con altre tipologie di Xenograft sono 44 dei quali 20 presentano risultati 'Optimal', 17 'Good', 5 'Poor' e due interventi risultano falliti. I materiali sintetici sono stati usati in 14 pazienti dei quali 6 presentano risultati 'Optimal', 4 'Good', 3 'Poor' e in un paziente è stato riportato un fallimento.

In 3 casi di GBR è stato utilizzato collagene riportando 2 risultati 'Good' e un risultato 'Poor'. Anche per 6 procedure di GBR è stato utilizzato un mix di materiali di origine diversa e, come per i 5 interventi di Sinus Lift, non è stato possibile assegnare la classe di appartenenza.

I risultati sono riportati in Tabella 4.

Materials adopted	GBR	Outcome evaluation					
		Cases	Optimal	Good	Medium	Poor	None
Autografts	35	20	11	1	1	1	1
Allografts	14	7	2	3	2	-	-
SmartBone®	34	25	5	-	2	-	2
Xenografts	44	20	17	-	5	-	2
Synthetic materials	14	6	4	-	3	-	1

Tabella 4: Risultati clinici dei materiali utilizzati per gli interventi di GBR

Si evince quindi dai dati che, per i pazienti sottoposti a tecnica di rigenerazione ossea guidata, l'osso autogeno ha una percentuale di successo dell'88,57% e un rate di fallimento pari al 2,85%; i 14 casi trattati con Allografts hanno una percentuale di successo del 64,28% e un rate di fallimento nullo; lo SmartBone® presenta una percentuale di successo pari a 88,23% e una percentuale di fallimento del 5,88%; i casi trattati con Xenografts riscontrano una percentuale di successo dell'84,09% e il 4,54% di fallimento; i materiali sintetici presentano il 71,42% di successo e il 7,14% di fallimento. La percentuale di fallimento di SmartBone® riscontrata nei casi di GBR risulta elevata (5,88%), soprattutto rispetto alla percentuale di fallimento degli altri Xenografts (4,54%); ciò è dovuto al fatto che SmartBone®, rispetto alla maggior parte degli altri materiali disponibili in granuli o paste, è stato utilizzato anche in blocchi di diversa dimensione e forma per difetti molto estesi e per procedure chirurgiche complesse, con rischi inevitabilmente maggiori.

Le percentuali di successo sono riportate in Tabella 5.

Materials adopted	GBR	% Satisfactory	% Failures
Autografts	35	88,57%	2,85%
Allografts	14	64,28%	0%
SmartBone®	34	88,23%	5,88%
Xenografts	44	84,09%	4,54%
Synthetic materials	14	71,42%	7,14%

Tabella 5: Risultati degli interventi con tecnica GBR

Si può affermare, grazie ad un'analisi complessiva (Tabella 6), che SmartBone® è stato usato per interventi di Sinus Lift e GBR su un totale di 89 soggetti, monitorati con follow-up a lungo termine, e tra questi, 77 hanno mostrato una rigenerazione ottima (> 80%) e 6 una rigenerazione buona (50-80%). Sono stati riportati in totale 3 fallimenti a causa di problemi chirurgici (infezioni attorno a viti, deiscenze) non dovuti quindi al materiale.

Materials adopted	Number of cases	%Satisfactory	%Failures
Autografts	45	88,89%	2,22%
Allografts	14	64,28%	0%
SmartBone®	89	93,25%	3,37%
Xenografts	46	84,78%	4,34%
Synthetic materials	37	83,78%	5,40%
Overall materials (SB included)	267	88,01%	2,99%
Overall materials (SB excluded)	178	85,39%	2,80%

Tabella 6: Risultati complessivi degli interventi

Dalle percentuali riportate in Tabella 6 è possibile effettuare inoltre un confronto tra SmartBone® e gli altri materiali disponibili sul mercato ed utilizzati nel trattamento dei casi clinici in esame. Si nota come la percentuale di successo di SmartBone® è pari a 93,25%, superiore a tutti gli altri materiali e soprattutto superiore alla percentuale degli altri

Xenografts sul mercato (pari a 84,78%), e presenta una percentuale di fallimento pari a 3,37%, superiore solo alla percentuale di fallimento degli Allografts che sono presenti però in numero esiguo (solo 14 casi).

Confrontando lo SmartBone® con il materiale di riferimento, risulta evidente come la percentuale di successo di SmartBone® (93,25%) sia superiore rispetto a quella dell'osso autologo (88,89%). Tuttavia, la percentuale di fallimento è più alta per i casi trattati con SmartBone® anche se, come precedentemente specificato, le cause di fallimento sono di natura chirurgica e non strettamente imputabili alle caratteristiche del materiale.

Prendendo in considerazione infine tutti i casi, incluso SmartBone®, e tutti i casi, escluso SmartBone®, si nota come la percentuale di successo diminuisca dall'88,01% all'85,39%, mentre la percentuale di fallimento risulta di poco superiore includendo i casi con SmartBone®.

Durante lo studio clinico non sono stati comunque osservati difetti del dispositivo, eventi avversi gravi o effetti indesiderati. Al contrario, la biocompatibilità di SmartBone® risulta ampiamente dimostrata, inoltre la bagnabilità del materiale permette in tutti i casi clinici di avviare il processo di integrazione del tessuto [37].

L'analisi eseguita sui dati raccolti consente di sottolineare i seguenti risultati:

- Le prestazioni e l'efficacia di SmartBone® sono state confermate dalle prove cliniche fornite;
- La percentuale di fallimenti in seguito agli interventi chirurgici è statisticamente accettabile e non sono emersi rischi per i pazienti durante lo studio;
- Gli innesti SmartBone® hanno permesso la rigenerazione di nuovo tessuto osseo, garantendo la stabilità a lungo termine degli impianti.

3.1.1 Valutazione della validità del campione ed esclusione di bias

In ogni analisi clinica è opportuno controllare che i dati grezzi non siano influenzati dalla presenza di bias che potrebbero minare le conclusioni ottenute attraverso l'analisi dei casi. In questo senso è quindi opportuno effettuare un'analisi statistica mirata ad identificare la

validità ed effettiva rappresentatività del campione. Come riportato nel paragrafo 2.1.3, i dati raccolti sono stati esaminati per verificare l'assenza di bias e correlazioni nascoste all'interno del database clinico. I risultati sono di seguito riportati.

Dalla distribuzione delle età dei pazienti (Figura 16), si nota come questa segua un andamento normale, con Skewness pari a 0,14 e Kurtosis pari a -0,51. Il valore di Skewness, prossimo allo 0, indica che la distribuzione presenta una leggera asimmetria positiva, con la coda più lunga a destra. Il valore di Kurtosis è inferiore a 0 e indica che la distribuzione è platicurtica, con una gibbosità in corrispondenza del valore massimo non elevata.

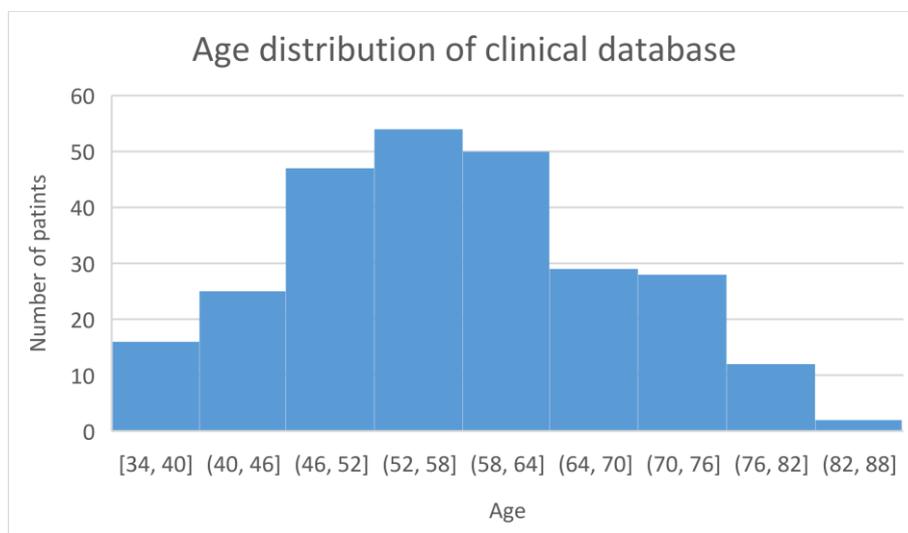


Figura 16: Distribuzione dell'età dei pazienti del database clinico

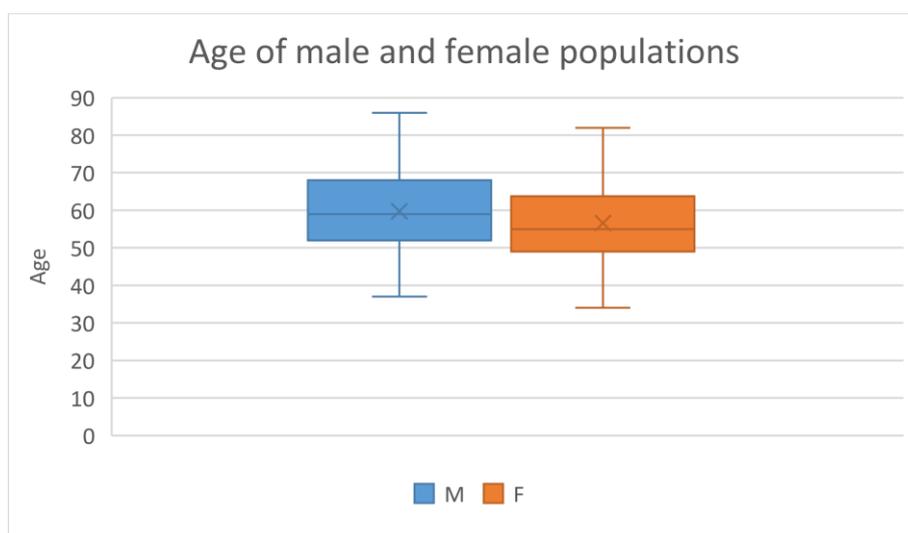


Figura 17: Boxplot delle età della popolazione maschile e femminile

Dai Boxplot riportati nel grafico in Figura 17 si nota che le due popolazioni sono confrontabili per quanto riguarda l'età. Non sono presenti outliers.

Anche le distribuzioni dell'età dei pazienti di sesso maschile (Figura 18) e femminile (Figure 19) risultano normali con valori di Skewness e Kurtosis pari rispettivamente a 0,07 e -0,38 per la popolazione maschile e 0,19 e -0,57 per la popolazione femminile.

Come per la popolazione totale, i valori di Skewness per le popolazioni dei pazienti di sesso maschile e femminile sono molto vicini allo 0 e sono positivi e ciò indica che le distribuzioni presentano una leggera asimmetria positiva. Inoltre, i valori di Kurtosis sono inferiori a 0 e indicano che le distribuzioni sono platicurtiche.

Le due distribuzioni risultano inoltre sovrapponibili: tramite t Test a due campioni assumendo varianze diverse, si ottiene un *P value a due code* pari a 0,025 ($< 0,05$) con un livello di confidenza del 95% ($\alpha = 0,05$). È possibile quindi affermare che le età delle due popolazioni sono mediamente uguali.

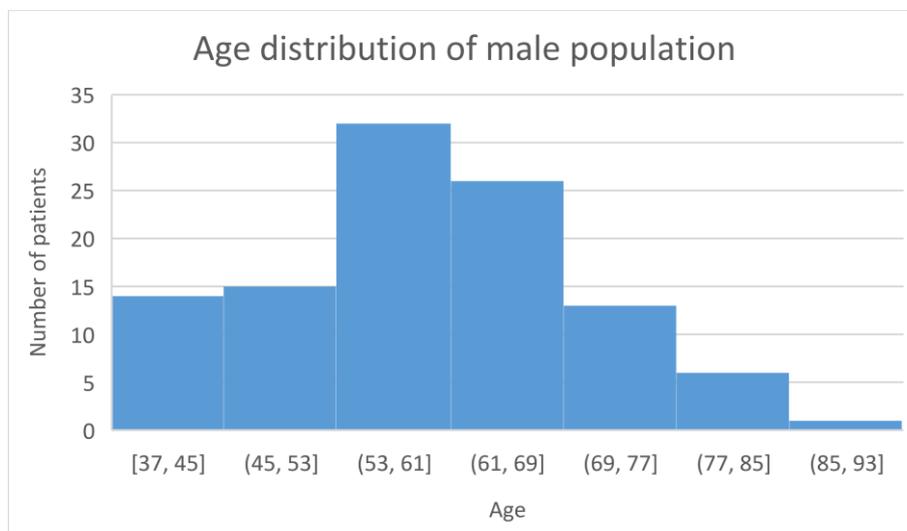


Figura 18: Database clinico- distribuzione età della popolazione di sesso maschile

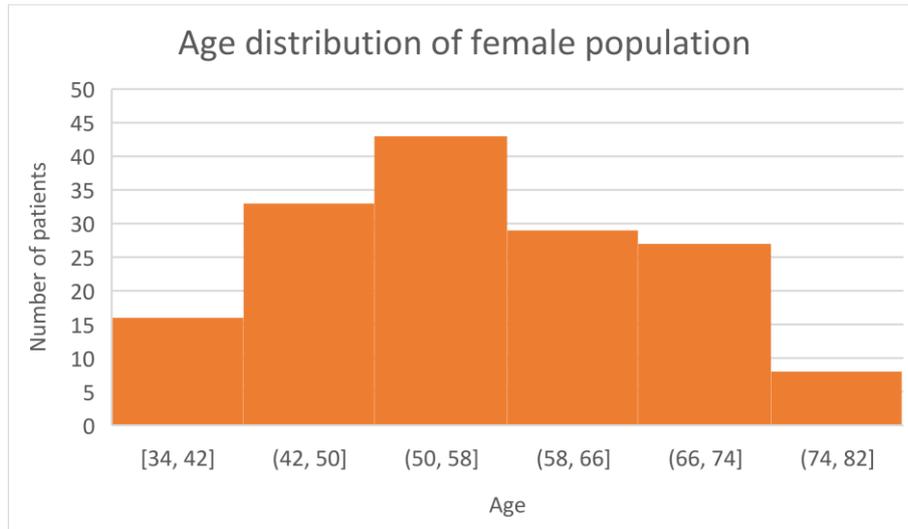


Figura 19: Database clinico- distribuzione età della popolazione di sesso femminile

In definitiva è quindi possibile escludere bias dovuti all'età dei pazienti coinvolti nello studio clinico, essendo questa normalmente distribuita in tutti i soggetti presi in esame.

Oltre alla distribuzione dell'età dei pazienti, per supportare l'attendibilità dello studio clinico, è stato necessario verificare che le percentuali di successo dei diversi materiali non fossero dipendenti da fattori che avrebbero potuto polarizzare i risultati. Questi fattori sono:

- Sesso del paziente
- Pazienti fumatori
- Pazienti con disturbi metabolici
- Utilizzo di membrana

Nei grafici sotto riportati, i casi con ottimi e buoni livelli di rigenerazione ossea sono stati indicati come 'Satisfactory' mentre i casi con livelli di rigenerazione medi, scarsi e nulli sono stati indicati come 'Unsatisfactory', come descritto nel capitolo Materiali e Metodi al paragrafo 2.1.2.

I fallimenti sono stati sotto riportati per completezza, ma non sono stati utilizzati per verificare la presenza di correlazioni nascoste all'interno dei dati, non essendo dovuti alle 'performance' dei materiali.

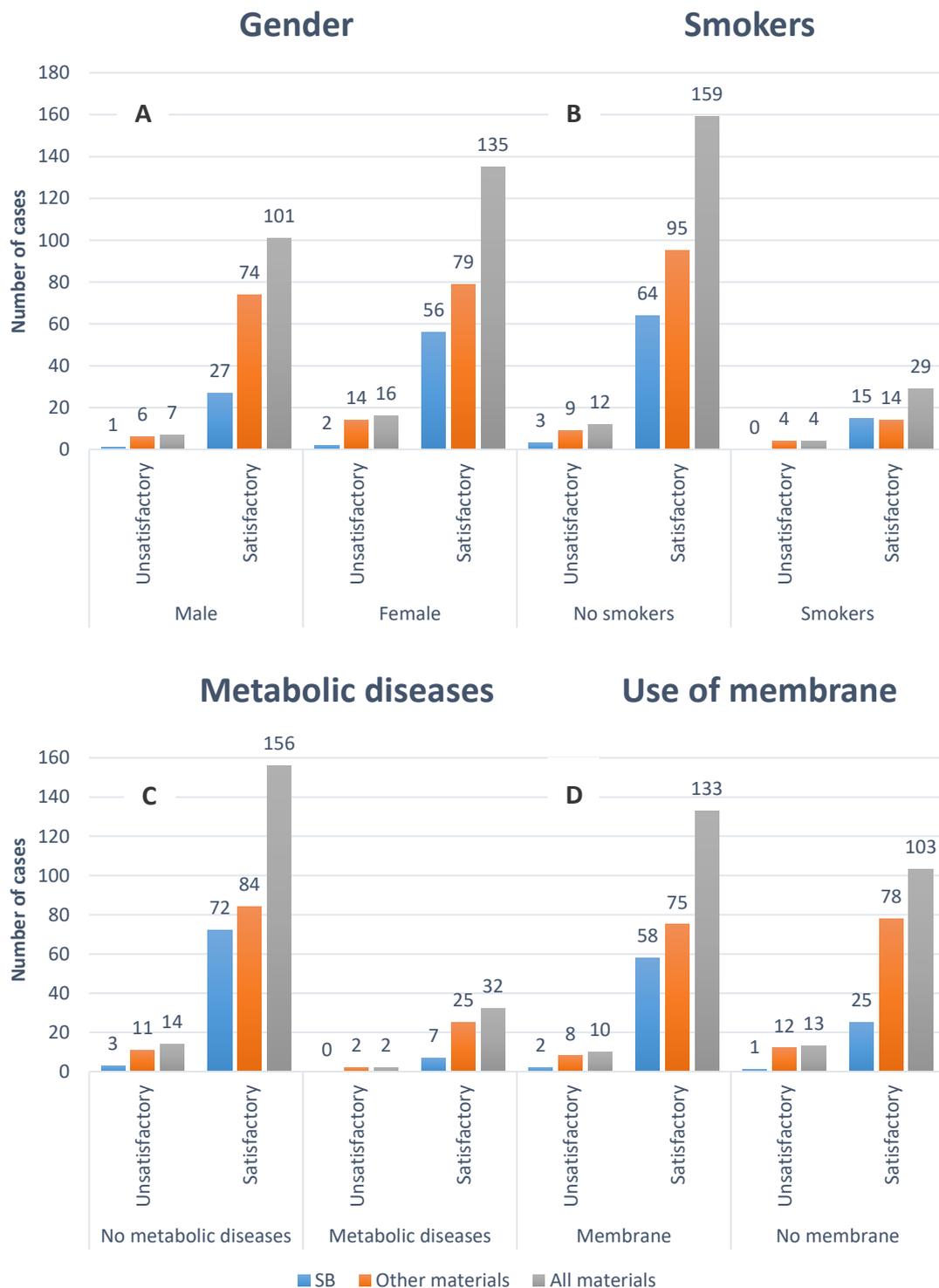


Figura 20: Verifica della presenza di bias in relazione al genere (A), abitudine al fumo (B), disturbi metabolici (C) e utilizzo di membrane (D)

I pazienti di sesso maschile sono 111 mentre i pazienti di sesso femminile sono 156, come precedentemente indicato.

Dal grafico A in Figura 20, si nota come l'utilizzo di SmartBone® riporta risultati soddisfacenti sia per i pazienti di sesso maschile che per i pazienti di sesso femminile: per la popolazione maschile la percentuale di successo è pari al 96,42%, mentre per la popolazione femminile presenta una percentuale di successo pari al 91,80%. Anche per gli altri materiali, escluso SmartBone®, si nota come le percentuali di successo siano rispettivamente l'89,15% per i pazienti di sesso maschile con 3 fallimenti e l'83,15% per i pazienti di sesso femminile con 2 fallimenti. Considerando infine tutti i materiali utilizzati, si ha il 91% di successo per la popolazione di sesso maschile e l'86,53% per la popolazione di sesso femminile. Le percentuali sono riportate in Tabella 7.

Materials adopted	% Satisfactory	
	<i>Male</i>	<i>Female</i>
SmartBone®	96,42%	91,80%
Other materials	89,15%	83,15%
All materials	91%	86,53%

Tabella 7: Percentuali di successo dei materiali usati per pazienti di sesso maschile e femminile

I pazienti fumatori sono 34, quelli non fumatori 177, mentre per 56 casi non è stato possibile identificare lo stato di salute dall'anamnesi in quanto o mancante o non recente.

Nel grafico B in Figura 20 sono riportati i casi con risultati soddisfacenti e non per pazienti fumatori e non fumatori, trattati con SmartBone® e altri materiali. All'interno del database clinico i pazienti non fumatori trattati con SmartBone® risultano essere 69: il 92,75% presenta buoni risultati, il 4,34% presenta risultati scarsi e sono stati riportati due fallimenti. I pazienti fumatori trattati con SmartBone® sono invece 16 e i risultati sono 15 successi e un fallimento, con il 93,75% di successo. Gli altri materiali sono usati in 108 pazienti non fumatori con la percentuale di successo pari a 87,96% e sono stati riportati 4 fallimenti mentre sono stati usati per 18 pazienti fumatori con una percentuale di successo pari 77,78% e nessun fallimento.

Considerando tutti i materiali utilizzati, compreso SmartBone®, si ha una percentuale di successo dell'89,83% per i pazienti non fumatori e dell'82,85% per i pazienti fumatori. Le percentuali sono riportate in Tabella 8.

Materials adopted	% Satisfactory	
	No smokers	Smokers
SmartBone®	92,75%	93,75%
Other materials	87,96%	77,78%
All materials	89,83%	82,85%

Tabella 8: Percentuali di successo dei materiali usati per pazienti non fumatori e fumatori

I pazienti con disturbi metabolici sono 37, i pazienti che non presentano disturbi metabolici 174 mentre per 56 pazienti non è stato possibile identificare lo stato di salute.

Nel grafico C in Figura 20 sono riportati i casi di pazienti con e senza disturbi metabolici, trattati con SmartBone® e altri materiali. Si nota come per i pazienti senza disturbi metabolici, SmartBone® è stato impiegato in 77 casi: la percentuale di successo è del 90% e sono stati registrati 2 fallimenti. Gli altri materiali sono stati utilizzati in 97 pazienti con una percentuale di successo dell'86,59% e 2 fallimenti. Considerando tutti i materiali usati, compreso SmartBone®, la percentuale di successo per i pazienti senza disturbi metabolici è 89,65%.

I pazienti con disturbi metabolici trattati con SmartBone® sono 8 e, tra questi, 7 presentano ottimi risultati: la percentuale di successo è dell'87,5% mentre non risultano casi con livelli medi, bassi o nulli di rigenerazione ossea; è stato riportato un fallimento. Gli altri materiali, escluso SmartBone®, sono stati utilizzati in 29 pazienti con disturbi metabolici e tra questi 25 presentano livelli ottimi di rigenerazione con una percentuale di successo dell'86,20%. 2 sono i casi con fallimento. Considerando tutti i materiali usati, compreso SmartBone®, la percentuale di successo per i pazienti con disturbi metabolici è dell'86,48%. Le percentuali sono riportate in Tabella 9.

Materials adopted	% Satisfactory	
	No metabolic diseases	Metabolic diseases
SmartBone®	90%	87,5%
Other materials	86,59%	86,20%
All materials	89,65%	86,48%

Tabella 9: Percentuali di successo dei materiali usati per pazienti senza e con disturbi metabolici

All'interno del database clinico, 148 risultano i casi con l'utilizzo di membrana mentre i restanti 119 interventi sono stati effettuati senza membrana.

Nel grafico D in Figura 20 sono riportati gli interventi eseguiti con e senza membrana: SmartBone® è stato utilizzato insieme alla membrana in 60 casi, con il 93,54% di successo e 2 casi falliti. Gli altri materiali hanno mostrata con la membrana l'87,20% di successo e 3 fallimenti. Nel complesso, considerando tutti i materiali, la percentuale di successo è dell'89,86% con l'impiego di membrane e i fallimenti sono 5 (Tabella 10).

Senza l'utilizzo di membrana, la percentuale di successo di SmartBone® è pari al 92,59% con un fallimento; per gli altri materiali la percentuale di successo è dell'84,78% con 2 fallimenti. Per tutti i materiali, compreso SmartBone®, senza l'utilizzo di membrana, la percentuale di successo è pari a 86,55% con 3 casi falliti (Tabella 10).

Materials adopted	% Satisfactory	
	Membrane	No membrane
SmartBone®	93,54%	92,59%
Other materials	87,20%	84,78%
All materials	89,86%	86,55%

Tabella 10: Percentuali di successo dei materiali usati con o senza l'utilizzo di membrane

Dai grafici in Figura 20 e dai dati riportati nelle Tabelle 7-10, si nota come le percentuali di successo degli innesti ossei utilizzati all'interno dello studio non sono dipendenti da condizioni cliniche specifiche o dagli altri fattori presi in esame e risultano comunque elevate. Nello specifico le performance dei materiali non risultano essere polarizzate dal sesso, dalle abitudini al fumo dei pazienti, dalla presenza di disturbi metabolici o dall'utilizzo o meno di membrane riassorbibili durante l'intervento. Considerando tutti i materiali, i successi sono in percentuale elevati sia per pazienti di sesso maschile (91%) sia per pazienti di sesso femminile (86,53%), allo stesso modo sia per pazienti fumatori (82,85%) sia per pazienti non fumatori (89,93%) e infine risultano confrontabili sia per pazienti senza patologie metaboliche (89,65%) sia con patologie metaboliche (86,48%) e in presenza (89,86%) o meno di membrana (86,55%).

Si può quindi concludere che non sono presenti bias o correlazioni nascoste all'interno del database clinico.

3.2 Risultati istologici

Il database istologico è costituito da 28 biopsie di chirurgia orale provenienti da siti innestati con SmartBone® e prelevati nel momento dell'inserimento dell'impianto. I pazienti sono stati sottoposti a tecniche chirurgiche diverse effettuate da operatori privati in tutta Italia. Sono stati raccolti 8 campioni da pazienti di sesso maschile e 20 campioni da pazienti di sesso femminile con un range di età tra 21 e 66 anni e un'età media di 55 ± 10 anni.

Non sono stati trovati bias o correlazioni nascoste tra le variabili investigate. La distribuzione di età e sesso risulta sovrapponibile ai dati di riferimento del mercato e noti dalla letteratura, mostrando che la popolazione primaria è quella anziana, con una significativa maggioranza di pazienti donne. Quest'ultimo dato risulta essere in parte giustificato dal mercato, visto che gli interventi chirurgici vengono effettuati in campo orale per migliorare anche la componente estetica.

Lo SmartBone® è stato utilizzato per procedure di Sinus Lift e in tecniche di GBR effettuate con l'utilizzo di chips ossee e blocchi.

Il tempo medio di prelievo delle biopsie, e quindi dell'inserimento degli impianti, è $6,4 \pm 1,9$ mesi con il 67,85% tra 4 e 7 mesi e il 32,15% tra 8 e 9 mesi.

Nel complesso risultano:

- **9 interventi di Sinus Lift:**
 - 5 prelievi dopo 4-5 mesi
 - 3 prelievi dopo 6-7 mesi
 - 1 prelievo dopo 9 mesi
- **19 interventi di rigenerazione ossea con tecnica GBR:**
 - 7 prelievi dopo 4-5 mesi (5 socket preservation con chips, 2 block technique)
 - 4 prelievi dopo 6-7 mesi (1 socket preservation con chips, 3 block technique)
 - 8 prelievi dopo 8-9 mesi (8 block technique)

I casi sono risultati soddisfacenti in tutte le loro fasi, dall'intervento chirurgico, al follow-up, fino all'impianto e alla protesi finale. Non sono stati rilevati effetti negativi e complicazioni dovuti al materiale di innesto; dopo un anno dall'intervento, è stata verificata la quantità e la qualità del tessuto osseo e la stabilità dell'impianto.

Sono di seguito riportati i risultati dalle analisi istomorfometriche, effettuate tramite software ImageJ, delle immagini istologiche digitalizzate tramite scanner Glissando™. Le percentuali di osso nuovo (NB), SmartBone® (SB), tessuto connettivo (CT) e altri tessuti (Others) ad un certo periodo (mesi) dall'intervento sono state ottenute mediando le percentuali dei diversi campioni. Allo stesso modo sono stati ottenuti gli indici BPC.

Gli interventi di Sinus Lift sono stati eseguiti su 4 pazienti di sesso maschile e 5 di sesso femminile, con range di età compreso tra 21 e 66 anni e età media pari a 53 anni.

Dai 5 campioni prelevati dopo 4-5 mesi, è risultata una percentuale di nuovo osso pari al 39,53%, una percentuale di SmartBone® pari al 22,51% e una percentuale di tessuto connettivo pari al 36,96%. I risultati sono riportati nel grafico A di Figura 21. L'indice BPC medio è pari a 0,32 che sta ad indicare che circa il 32% della superficie di SmartBone® è a contatto con osso nuovo.

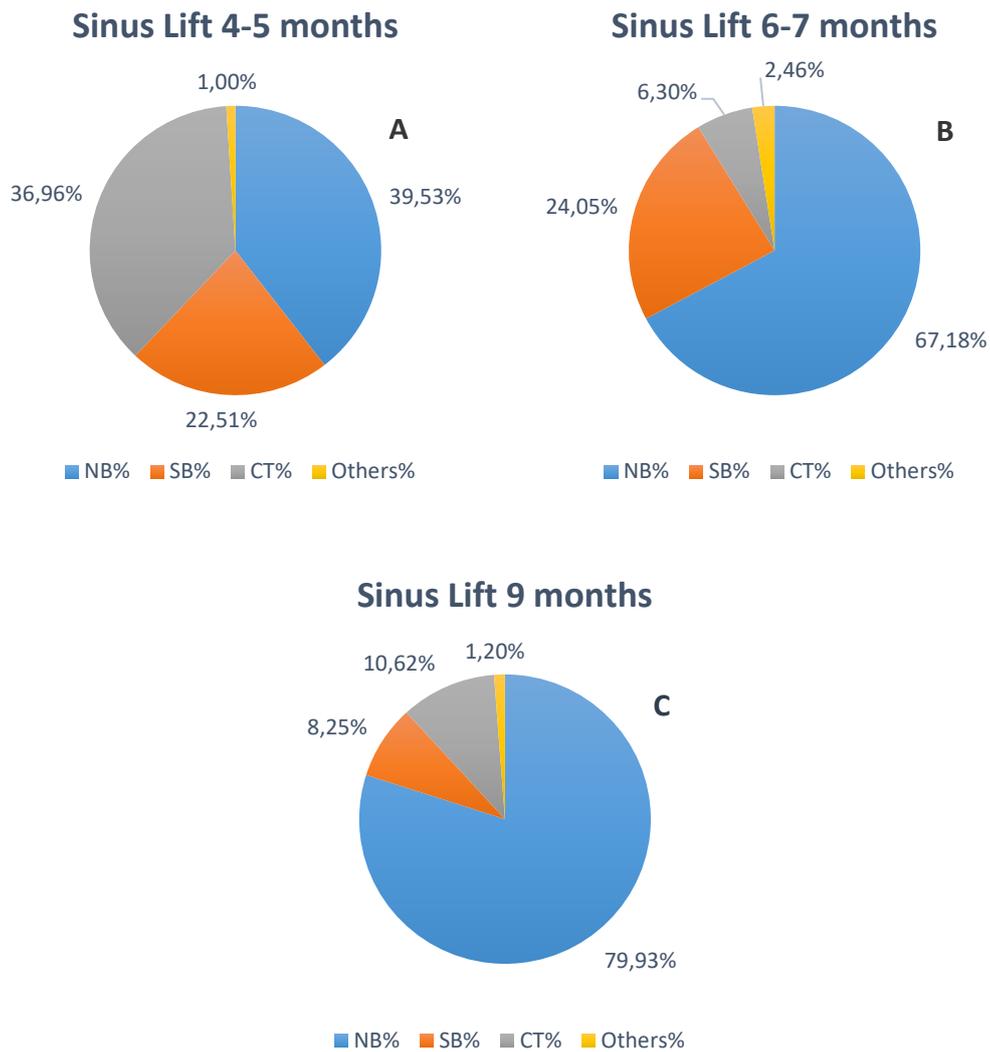


Figura 21: Analisi istomorfometrica che mostra le percentuali medie di osso nuovo (NB), SmartBone® (SB), tessuto connettivo (CT) e altri tessuti (Others) nelle biopsie prelevate rispettivamente a 4-5 (A), 6-7 (B), 8-9 (C) mesi dopo l'intervento di Sinus Lift

I risultati ottenuti sono superiori a quanto riportato in letteratura su analisi di biopsie a 4 mesi dall'impianto utilizzando Interpore® 200, un innesto osseo inorganico di origine bovina, in cui il volume di nuovo osso a seguito di una procedura di rialzo del seno mascellare risultava pari al 12% [53]. In altri studi, l'utilizzo di solo osso autogeno o l'uso congiunto di osso bovino inorganico (Bio-Oss®) e osso autologo hanno riportato, dopo 4 mesi, percentuali di volume osso comparabili con i risultati ottenuti con SmartBone® [54][55].

Dalle 3 biopsie prelevate al momento dell'inserimento dell'impianto dopo 6-7 mesi, la percentuale di osso nuovo è pari al 67,18%, quella di SmartBone® è pari al 24,05% e il tessuto connettivo è il 6,30% (Figura 21- B). L'indice BPC è pari a 0,44, maggiore rispetto all'indice medio calcolato per i campioni a 4-5 mesi dall'intervento, e indica che il 44% di SmartBone® presente è circondato da nuovo tessuto osseo.

I risultati di due studi presenti in letteratura [56][57] mostrano che, con l'utilizzo di un innesto osseo di origine bovina presente sul mercato (Bio-Oss®), le percentuali di nuovo osso ottenute sono state rispettivamente pari al 13,5% e al 18,30% dopo 6 mesi e al 22,3% dopo 7 mesi [58].

Il campione prelevato a 9 mesi presenta il 79,93% di osso nuovo, l'8,25% di SmartBone® che risulta quasi completamente riassorbito, e il 10,62% di tessuto connettivo (Figura 21- C). L'indice BPC è pari a 0,47.

Gli interventi di rigenerazione ossea con tecnica GBR sono stati eseguiti su 4 pazienti di sesso maschile e 16 di sesso femminile, con range di età tra 44 e 66 anni ed età media 57 anni.

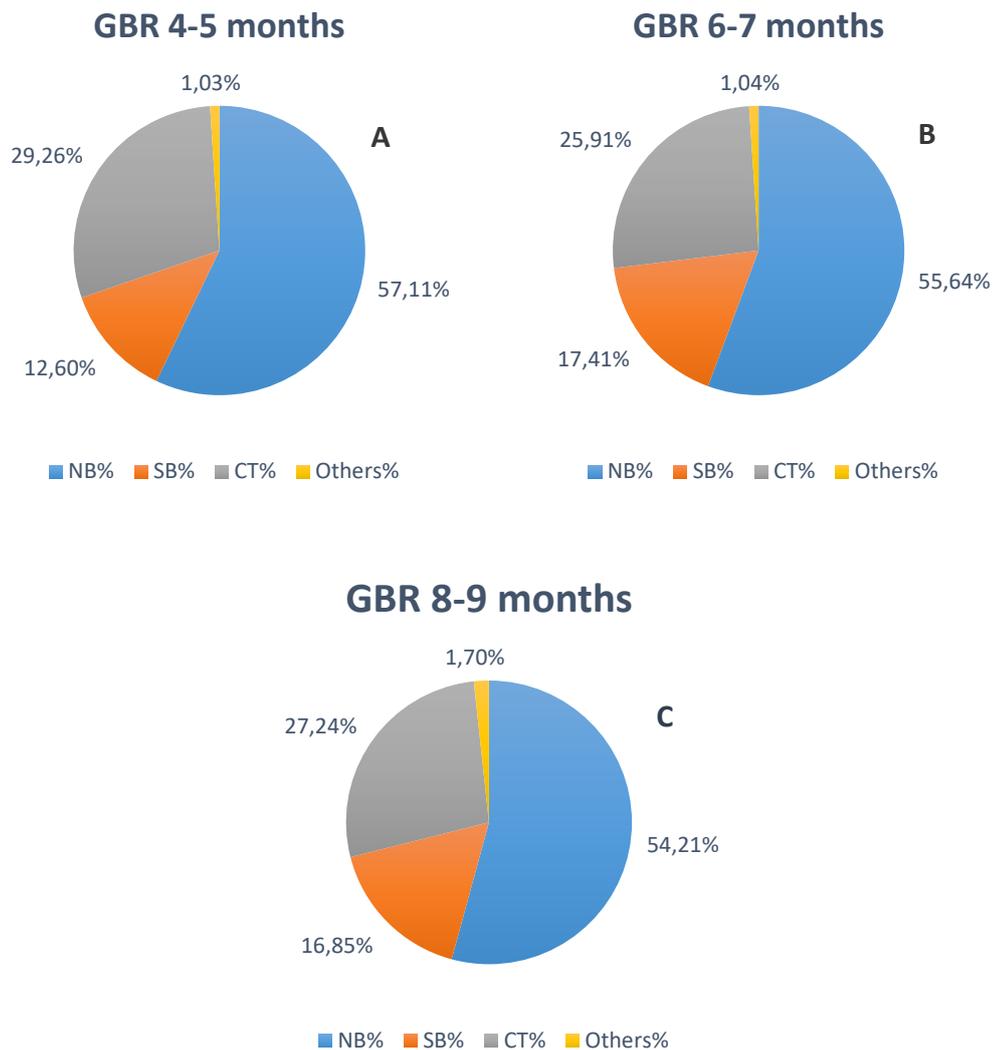


Figura 22: Analisi istomorfometrica che mostra le percentuali medie di osso nuovo (NB), SmartBone® (SB), tessuto connettivo (CT) e altri tessuti (Others) nelle biopsie prelevate rispettivamente a 4-5 (A), 6-7 (B), 8-9 (C) mesi dopo l'intervento di GBR

Nei 7 campioni prelevati dai 4 ai 5 mesi successivi all'intervento è stata ottenuta una percentuale di NB pari al 57,11%, SB 12,60%, CT 29,26% e un indice BPC uguale a 0,44. I risultati sono riportati nel grafico A di Figura 22.

I campioni prelevati dopo 6-7 mesi dall'intervento di rigenerazione ossea guidata sono 4: è stata ottenuta una percentuale di NB pari al 55,64%, SB 17,41%, CT 25,91% (Figura 22- B) e un indice BPC uguale a 0,44 che permette di evidenziare l'elevata osteoconduttività del materiale.

Riguardo agli interventi chirurgici con tecnica GBR, le biopsie a 8-9 mesi dall'intervento sono 8 e le percentuali sono: NB 54,21%, SB 16,85% e CT 27,24%, riportate nel grafico C di Figura 22. L'indice BPC è pari a 0,31.

Si può notare come in questo caso (GBR), la percentuale più elevata di nuovo tessuto osseo (57,11%) e la minor percentuale di SmartBone® (12,60%) si hanno nei campioni prelevati da 4 a 5 mesi dopo l'intervento. Ciò è dovuta al fatto delle 7 biopsie, 5 sono relative ad interventi di socket preservation e solo 2 relative ad interventi di incremento osseo con tecnica a blocco: la tecnica di socket preservation, come descritto nel paragrafo 1.4.2.3, prevede l'utilizzo di chips ossee che permettono meglio di riempire il sito del dente estratto. La degradazione di SmartBone® in formato di chips risulta più veloce rispetto al formato a blocco e ciò si ripercuote sul suo meccanismo di azione e sulle proprietà di osteoconduttività e osteoinduttività, con una rigenerazione di nuovo osso che avviene in maniera più rapida.

Al contrario, le biopsie a 6-9 mesi sono relative a tecniche di GBR con una netta maggioranza di SmartBone® in formato di blocco (11 block technique e solo 1 socket preservation), con il risultato di una più lenta degradazione del materiale (SB 16,85%-17,41%) e delle percentuali di nuovo osso (54,21%-55,64%) di poco inferiori alla percentuale di nuovo tessuto dopo 4-5 mesi dall'intervento (57,11%).

Il volume di nuovo osso risulta comunque circondato da abbondante tessuto connettivo ben strutturato e vascolarizzato e presenta qualità e quantità che permettono il posizionamento dell'impianto con una buona stabilità primaria [39]. Dopo 9 mesi, SmartBone® risulta quasi completamente assorbito (SB 16,85%).

Sono state infine calcolate le percentuali dei diversi tessuti ai diversi intervalli di tempo considerando insieme le biopsie di rialzo del seno mascellare e GBR. I risultati sono riportati in Figura 23.

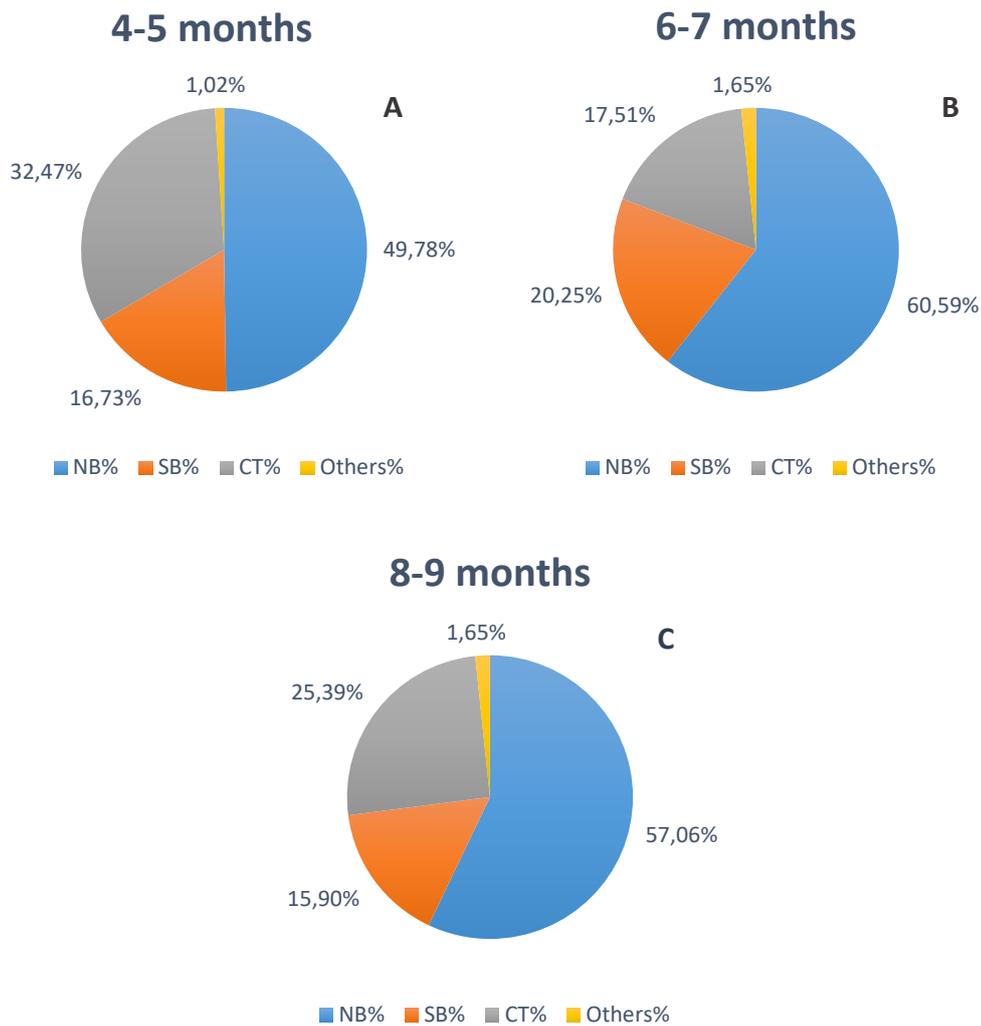


Figura 23: Analisi istomorfometrica che mostra le percentuali medie di osso nuovo (NB), SmartBone® (SB), tessuto connettivo (CT) e altri tessuti (Others) nelle biopsie prelevate rispettivamente a 4-5 (A), 6-7 (B), 8-9 (C) mesi dopo l'intervento di Sinus Lift e GBR

Dopo 4-5 mesi (A) dagli interventi si ha: NB 49,78%, SB 16,73%, CT 32,47 e un indice BPC medio pari a 0,39.

Dopo 6-7 mesi (B) sono presenti: NB 60,59%, SB 20,25%, CT 17,51% e indice BPC pari a 0,44.

Dopo 8-9 mesi (C) le percentuali calcolate sono: NB 57,06%, SB 15,90%, CT 25,39%. L'indice BPC medio è pari a 0,34.

I risultati ottenuti confermano nel complesso le proprietà di osteoconduzione e osteoinduzione di SmartBone®: gli innesti hanno incoraggiato le cellule indifferenziate a diventare osteoblasti attivi, favorendo la rigenerazione e la crescita di nuovo tessuto osseo,

che ha sostituito progressivamente il materiale iniziale, garantendo la stabilità degli impianti. La formazione di osso maturo avviene in circa 6 mesi.

3.3 Confronto tra dati di analisi clinica ed istologica

Dall'analisi dei due database è emerso che il database clinico è costituito da 267 pazienti, 111 di sesso maschile (41,6%) e 156 di sesso femminile (58,4%), l'età media è pari a 58 ± 11 anni e 117 sono gli interventi di Sinus Lift (43,8%) e 150 le rigenerazioni ossee con tecnica GBR (56,2%).

Il database istologico è meno popolato ed è composto da 28 biopsie, 8 prelevate da pazienti di sesso maschile (28,6%) e 20 da pazienti di sesso femminile (71,4%); l'età media è pari a 55 ± 10 anni, di poco inferiore rispetto all'età media del database clinico e sono stati eseguiti 9 interventi di Sinus Lift e 19 di rigenerazione ossea con tecnica GBR, con percentuali rispettivamente del 39,1% e del 67,9%.

Dal confronto tra le due popolazioni si nota come sia presente in entrambe una maggioranza significativa di pazienti di sesso femminile e di persone anziane, in linea con i dati di riferimento del mercato e con la letteratura.

Le procedure chirurgiche eseguite sui pazienti dei due database sono le stesse, con una maggioranza di interventi di rigenerazione ossea guidata rispetto alle procedure di rialzo del seno mascellare.

3.4 Metanalisi

Come descritto nel paragrafo 2.3, al fine di validare le buone proprietà e caratteristiche di SmartBone®, è stato necessario confrontare le percentuali di successo ottenute dal materiale all'interno del presente studio con le percentuali di successo riportate da altri materiali e dal materiale di riferimento (osso autogeno) all'interno di studi presenti in letteratura.

Una revisione sistematica dei principali database e di articoli di giornali scientifici è stata effettuata da Aghaloo et al. [50] con lo scopo di definire tecniche e materiali con le percentuali di successo più elevate, in grado di permettere il posizionamento e la stabilità a lungo termine degli impianti. Sono state raccolte dai diversi articoli le percentuali di successo che sono di seguito riportate: l'osso autogeno usato per le tecniche di Sinus Lift presenta una percentuale di successo pari al 92%, gli alloinnesti il 93,3%, gli xenografts il 95,6% di successo e i materiali sintetici l'81%; per quanto riguarda la tecnica GBR, il survival rate per l'osso autogeno è pari al 100% mentre per gli xenografts il survival rate degli impianti è pari al 97,1%. Non sono presenti articoli che hanno visto l'utilizzo di allografts o materiali sintetici per tecniche GBR all'interno dello studio di Aghaloo et al.

SmartBone® ha presentato all'interno di questo lavoro di tesi una percentuale di successo per quanto riguarda le procedure di Sinus Lift del 96,36%, superiore a tutti gli altri materiali e in particolare superiore alle percentuali di successo dell'osso autologo e degli xenografts evidenziate nel primo studio in esame. Per quanto riguarda gli interventi di GBR le percentuali sono inferiori (88%) in quanto SmartBone®, rispetto agli altri materiali disponibili in granuli o paste, è stato utilizzato anche in blocchi di diversa dimensione e forma per difetti molto estesi e per procedure chirurgiche complesse, con rischi inevitabilmente maggiori.

Un'analisi retrospettiva condotta da Knöfler et al. [51] ha riguardato il trattamento di pazienti sottoposti ad inserimento di impianti dentali a seguito di procedure di rigenerazione ossea (Sinus Lift e GBR) eseguite con diversi materiali da innesto. Gli interventi riusciti sono stati nel complesso il 96,33%. I materiali maggiormente utilizzati per il trattamento dei difetti ossei sono stati l'osso autogeno, Geistlich Bio-Oss®, xenograft di origine bovina, Cerasorb® e Bioresorb®, due materiali di natura sintetica. Nello specifico, l'osso autogeno ha riportato un survival rate pari al 96,06%, Geistlich Bio-Oss® 97,24% e Cerasorb® e Bioresorb® hanno avuto percentuali di successo minori, rispettivamente 89,44% e 93,10%.

Un terzo studio [52] ha valutato inoltre i risultati clinici in termini di ricrescita ossea e stabilità degli impianti in seguito a 456 ricostruzioni della cresta alveolare in 279 pazienti

con utilizzo di osso autologo. Questo ha dimostrato un survival rate degli impianti pari al 95,6%.

Nel complesso SmartBone® ha riportato una percentuale di successo del 93,25% per gli 89 casi trattati con procedure di Sinus Lift e tecniche GBR con un survival rate comparabile con quello del materiale di riferimento e superiore rispetto a quello dei materiali sintetici (Cerasorb® e Bioresorb®) [51][52].

La percentuale di successo del materiale in esame presenta una differenza ragionevolmente contenuta rispetto al competitor Geistlich Bio-Oss®, utilizzato in formato di granuli, con un valore inferiore del 4% [51].

Le percentuali di successo sono riassunte in Tabella 11.

References	Materials adopted	Surgical procedures		
		<i>Sinus Lift</i>	<i>GBR</i>	<i>Sinus Lift/GBR</i>
Aghaloo [2007]	<i>Autografts</i>	92%	100%	-
	<i>Allografts</i>	93,3%	-	-
	<i>Xenografts</i>	95,6%	97,1%	-
	<i>Synthetic materials</i>	81%		-
Knöfler [2016]	<i>Autografts</i>	-	-	96,06%
	<i>Xenografts</i>	-	-	97,24% (Bio-Oss®)
	<i>Synthetic materials</i>	-	-	89,44% (Cerasorb®) 93,10% (Bioresorb®)
Sakkas [2017]	<i>Autografts</i>	-	-	95,6%
SmartBone®	<i>SmartBone®</i>	96,36%	88%	93,25%

Tabella 11: Percentuali di successo di SmartBone® e degli altri materiali presenti in letteratura usati per procedure di Sinus Lift e tecniche GBR

4 Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato condotto uno studio retrospettivo al fine di valutare il funzionamento di SmartBone® quando utilizzato nel campo della chirurgia ricostruttiva orale, confrontandolo con i diversi materiali disponibili sul mercato e noti nella pratica clinica corrente, al fine di definire “safety and performance” del prodotto. Lo studio comparativo è stato condotto utilizzando differenti sostituti ossei di diversa origine, utilizzati per il trattamento di 267 pazienti, sottoposti a procedure di ricostruzione e rigenerazione ossea al fine di ottenere la fissazione dell'impianto o preservare il tessuto osseo circostante. Per supportare ulteriormente le indicazioni cliniche è stato effettuato uno studio osservazionale su casi clinici standard registrati e relativi all'uso di SmartBone® in applicazioni dentali da parte di operatori privati in tutta Italia. In particolare, lo studio ha visto la raccolta di 28 biopsie dai siti innestati e l'analisi istologica dei campioni per mettere in evidenza il meccanismo d'azione di SmartBone®.

Dall'analisi dei 267 casi clinici, SmartBone® presenta una percentuale di successo pari al 93% (96,4% per le procedure di Sinus Lift e 88,2% per le tecniche di GBR), superiore a quella dell'osso autogeno (89%), presente in letteratura come materiale di riferimento. Inoltre, presenta un rate di fallimento statisticamente accettabile, inferiore rispetto a tutti gli altri materiali di origine sintetica e soprattutto rispetto agli alti competitors (xenografts) presenti sul mercato, a conferma dell'efficacia e delle ottime prestazioni del materiale.

Dall'analisi immunoistochimica delle 28 biopsie, è evidente come per gli interventi di Sinus Lift la formazione di nuovo tessuto osseo e il conseguente riassorbimento di SmartBone® avvenga in modo graduale e dopo 9 mesi dall'intervento la percentuale di nuovo osso è pari all'80% circa con una percentuale di SmartBone® dell'8%. Per gli interventi di rigenerazione ossea con tecnica GBR il meccanismo di azione del materiale è meno evidente in quanto l'utilizzo di blocchi per il trattamento di difetti più estesi comporta, oltre a maggiori rischi chirurgici, un'integrazione e una rigenerazione ossea più lente. Le percentuali di nuovo tessuto osseo sono comunque superiori al 50%.

Complessivamente, dall'analisi istologica si ottengono già dopo 4-5 mesi dall'intervento buone percentuali di nuovo tessuto osseo, circa il 50%, e percentuali di SmartBone® del 15% dopo 9 mesi. È presente tessuto connettivo ben strutturato e vascolarizzato.

Il Bone-Particle Conductivity Index (BPCi) varia in un range compreso tra 0,34 e 0,44, con più del 30% di SmartBone® che si trova a contatto con nuovo osso.

È quindi possibile affermare che SmartBone® presenta caratteristiche osteoconduttive e osteoinduttive, guidando la crescita riparativa dell'osso naturale e incoraggiando le cellule indifferenziate a diventare osteoblasti attivi. Il materiale permette la rapida rigenerazione del tessuto osseo e garantisce la stabilità a lungo termine degli impianti. L'assenza di cellule infiammatorie conferma la biocompatibilità e la non immunogenicità di SmartBone® che viene riassorbito e sostituito da osso maturo nel giro di 7 mesi.

A seguito dello studio di metanalisi ed al confronto con i dati di letteratura è stato infine possibile riscontrare che SmartBone® presenta un survival rate comparabile con quello del materiale di riferimento (osso autogeno) e ha percentuali di successo superiori rispetto agli altri xenografts e ai materiali sintetici presenti sul mercato, soprattutto per quanto riguarda le procedure di Sinus Lift. Per quanto riguarda invece gli interventi con tecniche GBR, la percentuale di successo del materiale in esame risulta inferiore rispetto ai competitors dato che SmartBone®, rispetto alla maggior parte degli altri materiali usati in granuli o paste, è stato utilizzato anche in blocchi di diversa dimensione e forma per difetti molto estesi e per procedure chirurgiche complesse, con rischi inevitabilmente maggiori.

Bibliografia

- [1] T. Testori, "IL rialzo del Seno Mascellare," *Ital. Oral Surgery*, pp. 1–10, 2005.
- [2] D. S. Oh *et al.*, "Distinctive Capillary Action by Micro-channels in Bone-like Templates can Enhance Recruitment of Cells for Restoration of Large Bony Defect," no. September, pp. 1–9, 2015.
- [3] V. Campana *et al.*, "Bone substitutes in orthopaedic surgery : from basic science to clinical practice," 2014.
- [4] *Anatomia scheletro e muscoli*. Firenze: Giunti Gruppo Editoriale, 2003.
- [5] "Osso mascellare del cranio: anatomia e funzioni in sintesi," 2018. [Online]. Available: <https://medicinaonline.co/2018/03/16/osso-mascellare-del-cranio-anatomia-e-funzioni-in-sintesi/>.
- [6] A. Pasqualino and E. Nesci, *Anatomia umana fondamentale*. 1980.
- [7] V. B. Sabattini, *Tecniche ricostruttive e rigenerative dei mascellari atrofici. I biomateriali: scelta, indicazioni e metodi d'uso. Lo stato dell'arte, follow up e prospettive*. TU.E.OR. Turin Editorial Organization, 2007.
- [8] H. F. Wolf, M. Rateitschak, K. H. Rateitschak, and M. Simion, *Parodontologia*. Elsevier, 2015.
- [9] L. Piloni, "Evaluation methods of bone graft integration in reconstructive surgeries and consequent data analysis."
- [10] A. Genovesi, C. Sanavia, and G. Nardi, *Manuale pratico per l'igienista dentale*. SEE-Firenze, 2004.
- [11] M. Navarro *et al.*, "Biomaterials in orthopaedics Biomaterials in orthopaedics," pp. 1137–1158, 2008.
- [12] R. Bedini, R. Pecci, P. Ioppolo, D. Meleo, A. Bianco, and P. Casti, "Proposta di

- valutazione microtomografica di alcuni sostituti ossei,” 2009.
- [13] A. Acocella, “Materiali da innesto,” pp. 49–71.
- [14] G. Pecora, D. De Leonardis, and J. Ricci, *L’uso del Solfato di calcio nelle tecniche rigenerative multidisciplinari*. Elite Service Edizioni.
- [15] E. Olgun, S. Y. Ozkan, H. T. Atmaca, M. Yalim, and M. K. Hendek, “Comparison of the clinical, radiographic, and histological effects of titanium-prepared platelet rich fibrin to allograft materials in sinus-lifting procedures,” *J. Investig. Clin. Dent.*, no. March, p. e12347, 2018.
- [16] L. Chirilă, C. Rotaru, I. Filipov, and M. Săndulescu, “Management of acute maxillary sinusitis after sinus bone grafting procedures with simultaneous dental implants placement - a retrospective study,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 16, no. 1, 2016.
- [17] Massimiliano Lanza, “Piccolo rialzo del seno mascellare con innesto di biomateriale,” *Dent. Trib.*, 2009.
- [18] R. Chandran, “Maxillary sinus floor elevation,” 2017. [Online]. Available: <https://www.slideshare.net/RChandranSA/maxillary-sinus-floor-elevation>.
- [19] G. Carusi, M. Salin, and M. Scilla, *Tecnica MISE. Procedure chirurgiche*. Edra, 2016.
- [20] F. G. Draenert, D. Huetzen, A. Neff, and W. E. G. Mueller, “Vertical bone augmentation procedures: Basics and techniques in dental implantology,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 5, pp. 1605–1613, 2014.
- [21] lennielan, “Horizontal Ridge Augmentation – Block Graft + Guided Bone Regeneration,” 2015. [Online]. Available: <https://lennielan.wordpress.com/2015/08/16/horizontal-ridge-augmentation-block-graft-guided-bone-regeneration/>.
- [22] M. Chiapasco, F. Gatti, and A. Vizzari, “La rigenerazione ossea guidata (GBR) a scopo implantare,” 2010.
- [23] L. Heitz-Mayfield and A. Mombelli, “The Therapy of Peri-implantitis: A Systematic

- Review,” *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 29, no. Supplement, pp. 325–345, 2014.
- [24] R. P. Stuart Froum, Scott Froum, “Successful Management of Peri-Implantitis with a Regenerative Approach: A Consecutive Series of 51 Treated Implants with 3-to 7.5-Year Follow-up.,” *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, vol. 32, no. 1, pp. 11–20, 2012.
- [25] Scott Froum, “Review of the treatment protocols for peri-implantitis,” 2011. [Online]. Available: <https://www.dentistryiq.com/articles/2011/10/review-of-the-treatment-protocols-for-peri-implantitis.html>.
- [26] N. Claffey, E. Clarke, I. Polyzois, and S. Renvert, “Surgical treatment of peri-implantitis,” *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, no. SUPPL. 8, pp. 316–332, 2008.
- [27] G. Tarquini, “Perimplantiti: terapia chirurgica rigenerativa,” 2012. [Online]. Available: <https://www.osteocom.net/osteocom/modules.php?name=CasiClinici&op=scheda&clid=226>.
- [28] T. Irinakis, “Rationale for socket preservation after extraction of a single-rooted tooth when planning for future implant placement,” *J. Can. Dent. Assoc. (Tor.)*, vol. 72, no. 10, pp. 917–922, 2007.
- [29] T. Kosinski, “Socket Preservation Techniques All Dentists Can Implement Regardless of Extraction or Grafting Experience,” pp. 46–50, 2016.
- [30] G. Kotsakis, V. Chrepa, N. Marcou, H. Prasad, and J. Hinrichs, “Flapless Alveolar Ridge Preservation Utilizing the ‘Socket-Plug’ Technique: Clinical Technique and Review of the Literature,” *J. Oral Implantol.*, vol. 40, no. 6, pp. 690–698, 2014.
- [31] M. N. Gamba, “Innesto di Tessuto Connettivo Autologo Proveniente dalla Polpa Dentaria nella Rigenerazione Tissutale Guidata dei Difetti Infraossei.”
- [32] Geistlich Biomaterials, “Concetti di trattamento per la chirurgia parodontale rigenerativa.”

- [33] P. N. Lang and J. Lindhe, *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 2015.
- [34] H. F. Wolf, M. Rateitschak, and K. H. Rateitschak, *Parodontologie: Farbatlanten der Zahnmedizin*. 2012.
- [35] S. M. Rocchietta I, Schupbach P, Ghezzi C, Maschera E, "Soft tissue integration of a porcine collagen membrane: an experimental study in pigs," *Int J Periodontics Restor. Dent.*, vol. 32, no. 1, pp. 34–40, 2012.
- [36] P. F. M. Gielkens *et al.*, "The Influence of Barrier Membranes on Autologous Bone Grafts," *J. Dent. Res.*, vol. 87, no. 11, pp. 1048–1052, 2008.
- [37] G. Pertici, F. Rossi, T. Casalini, and G. Perale, "Composite polymer-coated mineral grafts for bone regeneration : material characterisation and model study," pp. 1–7, 2015.
- [38] F. Paronuzzi Ticco, T. Villa, and G. Perale, "Valutazione sperimentale della compatibilità biomeccanica di un sostituto osseo per l'osteotomia tibiale," 2015.
- [39] G. PERTICI *et al.*, "COMPOSITE POLYMER-COATED MINERAL SCAFFOLDS FOR BONE REGENERATION : FROM MATERIAL CHARACTERIZATION TO HUMAN STUDIES," *J. Biol. Regul. Homeost. AGENTS*, vol. 29, no. 3, pp. 136–148, 2015.
- [40] N. Poonia, H. Morales, and L. Mahesh, "Management of a Failed Implant Site with Guided Bone Regeneration , Reimplantation , and Root Submergence Technique," vol. 7, no. August, pp. 1–3, 2016.
- [41] I. Zollino, G. Carusi, F. Carinci, and G. Perale, "Positioning of a Contextual Implant Along with a Sinus Lift with SmartBone® Microchips of Composite Heterologous-Synthetic Bone," vol. 6, no. 2, pp. 59–62, 2015.
- [42] D. D'Alessandro *et al.*, "Bovine bone matrix/poly(L-lactic-co-ε-caprolactone)/gelatin hybrid scaffold (SmartBone®) for maxillary sinus augmentation: A histologic study on bone regeneration," *Int. J. Pharm.*, vol. 523, no. 2, pp. 534–544, 2017.
- [43] K. P. Egan, T. A. Brennan, and R. J. Pignolo, "Bone histomorphometry using free and commonly available software," *Histopathology*, vol. 61, pp. 1168–1173, 2012.

- [44] G. Guglielmi, G. Guglielmi, F. Urbano, V. Cappuccini, S. Giovanni, and R. Fg, "Diagnostica radiologica e densitometrica," vol. 5, pp. 259–265.
- [45] C. Cann and H. Genant, "Precise measurement of vertebral mineral content using computed tomography," *J Comput Assist Tomogr*, vol. 4, no. 4, pp. 493–500, 1980.
- [46] "Revisione sistematica," *Wikipedia*. 2018.
- [47] "Gli indici di forma." [Online]. Available: <https://www.simone.it/catalogo/v43.pdf>.
- [48] F. Scotti, "Il test di Student Il test di di Student," pp. 1–7, 2006.
- [49] "Objective Imaging." [Online]. Available: <http://www.objectiveimaging.com/>.
- [50] T. L. Aghaloo and P. K. Moy, "Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement?," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 22 Suppl, pp. 49–70, 2007.
- [51] W. Knöfler, T. Barth, R. Graul, and D. Krampe, "Retrospective analysis of 10,000 implants from insertion up to 20 years—analysis of implantations using augmentative procedures," *Int. J. Implant Dent.*, vol. 2, no. 1, p. 25, 2016.
- [52] A. Sakkas, F. Wilde, M. Heufelder, K. Winter, and A. Schramm, "Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a 'gold standard'? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures," *Int. J. Implant Dent.*, vol. 3, no. 1, p. 23, 2017.
- [53] S. L. Wheeler, R. E. Holmes, and C. J. Calhoun, "Six-year clinical and histologic study of sinus-lift grafts," *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.*, vol. 11, pp. 26–34, 1996.
- [54] E. S. Tadjedin, G. L. de Lange, P. J. Holzmann, L. Kulper, and E. H. Burger, "Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range," *Clin. Oral Implant. Res.*, vol. 11, pp. 334–344, 2010.
- [55] Z. Artzi, A. Kozlovsky, C. E. Nemcovsky, and M. Weinreb, "The amount of newly formed bone in sinus grafting procedures depends on tissue depth as well as the type and residual amount of the grafted material," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 32, pp.

- 193–199, 2005.
- [56] M. Yildirim, H. Spiekermann, S. Biesterfeld, and D. Edelhoff, “Maxillary sinus augmentation using xenogeneic bone substitute material Bio-Oss® in combination with venous blood,” *Cli. Oral Implant. Res.*, vol. 11, pp. 217–229, 2000.
- [57] Y. M. Lee, S. Y. Shin, J. Y. Kim, S. B. Kye, Y. Ku, and I. C. Rhyu, “Bone reaction to bovine hydroxyapatite for maxillary sinus floor augmentation: histologic results in humans,” *Int. J. Periodontics Restor. Dent.*, vol. 26, pp. 471–481, 2006.
- [58] S. J. Froum, S. S. Wallace, N. Elian, S. C. Cho, and D. P. Tarnow, “Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study.,” *Int. J. Periodontics Restor. Dent.*, vol. 28, pp. 273–281, 2008.
- [59] J. McNeil, L. Piccenna, K. Ronaldson, and E. Al., “The Value of Patient-Centred Registries in Phase IV Drug Surveillance,” *Pharm Med*, vol. 24, no. 5, pp. 281–288, 2010.