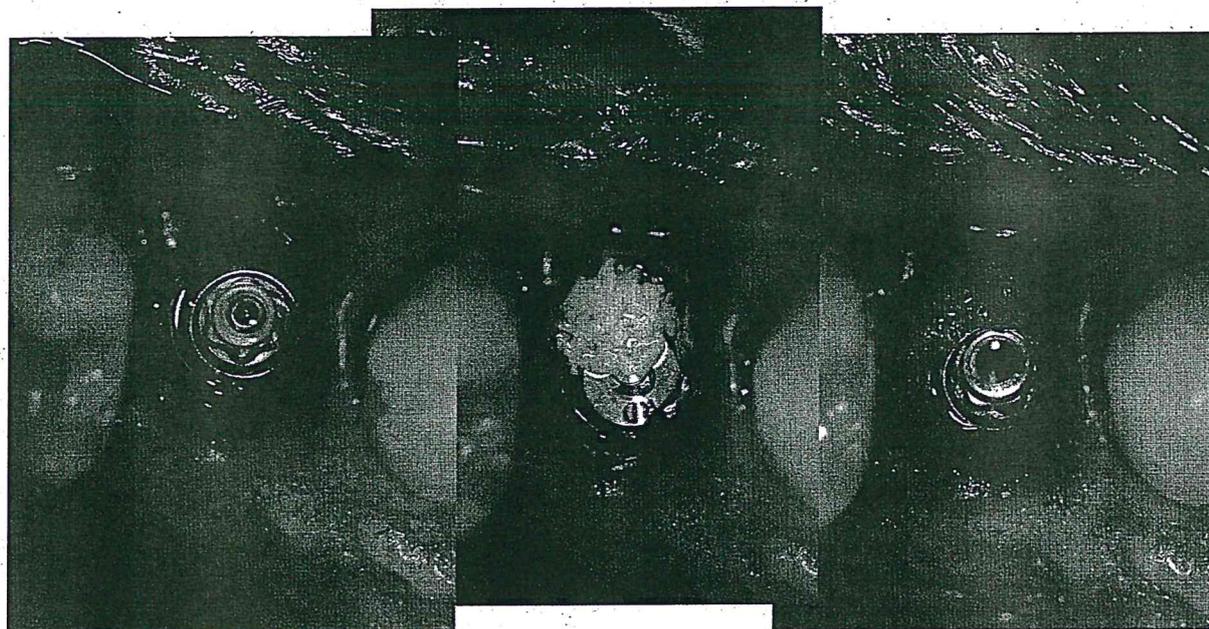


I biomateriali per la rigenerazione ossea

- Parte II -

D. De Santis, E. Baldisserri, A. Anesi, A. Baltieri, A. Fior,
B. Guarnieri, F. Ruscitti



Parole chiave: osso allogenico, materiale xenoplastico, osso alloplastico.

Dalle prime esperienze di Boyne¹ la rigenerazione ossea guidata (GBR) è diventata una metodica indicata per la riabilitazione implantare nelle aree edentule ed atrofiche. Su questo fronte il continuo impegno di clinici, ricercatori ed industrie specializzate ha contribuito allo sviluppo di biomateriali e metodiche operative che forniscono al paziente standard elevati di qualità ed affidabilità dei processi produttivi.

I Biomateriali

Osso allogenico

Osso di banca demineralizzato (h-DFDBA) o mineralizzato (h-FDBA)

Il h-DFDBA (human-Demineralized freeze-dried bone allografts) è stato utilizzato

con successo da solo o in innesti composti per molte decadi. Noumbissi¹⁵ in uno studio valuta istologicamente ed istomorfometricamente un nuovo innesto osseo mineralizzato in rialzi di seno mascellare¹⁶. Gli Autori hanno confrontato l'innesto di osso midollare (mineralized solvent-dehydrated cancellous bone allograft) Puros con un innesto composto da DFDBA insieme ad osso bovino deproteinizzato eterologo (1:1). In tutti i casi gli impianti posizionati si sono osteointegrati. Secondo gli Autori il mineralized solvent-dehydrated cancellous bone allograft (Puros) si è rimodellato molto più velocemente ed ha formato una maggiore quantità di osso rispetto al controllo, forse per la sua minor dimensione nelle particelle¹⁷. Petrunaro¹⁸ ha descritto la possibilità di utilizzare blocchi di osso allogenico nelle atrofie mascellari innestati sia in senso orizzontale che verticale^{18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25}. Piattelli²⁶ confronta istologicamente ed istochimicamente l'FDBA con il DFDBA in rigenerazione

L'OEBD presenta il vantaggio di un limitato costo biologico per il paziente

ossea e descrive un maggior effetto osteoconduttivo nell' FDDBA²⁷. Studi che risalgono agli anni Sessanta e Settanta hanno dimostrato che sia l'eliminazione della componente inorganica che il processo di congelamento aumentano l'osteconduttività dell'innesto osseo una volta posizionato nel sito ricevente; si ritiene inoltre che la demineralizzazione aumenti la disponibilità dei diversi fattori di crescita e quindi l'osteinduzione. Secondo altri autori questi materiali servirebbero solo da "impalcatura", da scaffold. Questa difformità di risultati scientifici può essere dovuta alla scarsa omogeneità dei campioni di osso ottenuti dalle diverse banche di osso (che differiscono per età, sesso e metabolismo osseo)²⁸.

Materiale xenoplastico

Osso bovino deproteinizzato (OEBD)

Nella ricostruzione dei piccoli difetti ossei delle creste edentule dei mascellari atrofici viene utilizzato l'osso eterologo bovino deproteinizzato (OEBD), un materiale osteoconduttivo usato in associazione o in alternativa all'osso autologo^{29, 30, 31, 32, 33, 34, 35}.

L'OEBD proprio per la sua origine naturale, presenta la stessa composizione chimica dell'osso umano

L'OEBD presenta il vantaggio di un limitato costo biologico per il paziente, ma anche il difetto di una ridotta osteoattività rispetto all'osso autologo. L'OEBD sfrutta solo il meccanismo dell'osteconduzione per cui l'osteopoesi si ottiene solo per difetti a tre o quattro pareti (ad esempio nei difetti cistici o nel rialzo di

seno mascellare). Un metodo per aumentare le proprietà osteogeniche dell'OEBD è quello di effettuare colture di osteoblasti umani ricavati da espianti ossei e di far proliferare le cellule così ottenute all'interno della matrice tridimensionale dell'OEBD³.

L'osso eterologo bovino deproteinizzato (OEBD), cioè il Bio-Oss[®] è un minerale osseo naturale, deproteinato, ricavato dall'osso bovino, ed entra così nei prodotti da innesto classificati come eterologi. Il Bio-Oss[®], proprio per la sua origine naturale, presenta la stessa composizione chimica dell'osso umano con un indice Ca/P identico (Tab.1).

Il Bio-Oss[®] deve la sua elevata osteoattività a tre meccanismi fondamentali:

- 1- Biomimetismo
- 2- Bone binding
- 3- Osteoconduzione

Si definisce biomimetismo la caratteristica di presentare la stessa composizione chimica, la stessa cristallinità e porosità del tessuto osseo, in toto o sulla superficie (Nocini P.F., Chiarini L. & De Santis D., 2005)³. Infatti l'OEBD è utilizzato come matrice tridimensionale per le colture di cellule osteoblastiche proprio grazie al suo elevato biomimetismo:

- 1 - I sostituti ossei naturali presentano la medesima struttura micro/macroskopica dell'osso autologo;

| | Osso Spugnoso umano | Bio-Oss [®] |
|------------------------------|---------------------|----------------------|
| Area superficie interna (nm) | 50 - 90 | 97 |
| Porosità totale (%) | 60 | 60 |
| Dimensione Cristalli (nm) | 10 - 50 | 10 - 60 |
| Indice Ca/P | 2.03 | 2.03 |

Tab. 1.

La struttura porosa del materiale permette la rivascolarizzazione (angiogenesi) del tessuto

2 - Il Bio-Oss® è un sostituto osseo ricavato dall'osso bovino costituito dalla sola componente minerale e deve le sue proprietà alla derivazione naturale. L'osso eterologo deve essere sempre deproteinizzato per annullare il pericolo di trasmissioni di malattie virali o prionali come il morbo di Creutzfeldt- Jakob nell'uomo e della Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) nel bestiame. Stretti controlli assicurano alti standard di qualità³⁶, ed inoltre nel processo di produzione viene attuato un protocollo rigido e severo nel quale tutti i lotti di Bio-Oss® vengono esaminati singolarmente con sistemi analitici validati e con metodi altamente sensibili, per escludere la presenza di eventuali residui proteici³⁷. Il Bio-Oss® ha conseguito la certificazione nella categoria dei presidi medici in tutti i paesi dell'Unione Europea (CE) ed ha ottenuto l'approvazione dell'American Food and Drug Administration (FDA) nella medesima classe merceologica.

3 - L'osso eterologo deve essere infine sterilizzato mediante radiazioni gamma: questo processo non denatura il biomateriale che conserva la struttura reticolare costituita da pori intercomunicanti tipica dell'osso spongioso naturale.

La materia prima del Bio-Oss® è di provenienza controllata e garantita; gli animali devono essere giudicati sani da vete-

rinari ed il prelievo dell'osso avviene nel rispetto di rigide procedure atte a garantire qualità e sicurezza.

Con il Bio-Oss® si dispone di un materiale sostitutivo molto simile all'osso naturale per cui viene sottoposto in vivo al processo fisiologico di rimodellamento (attivazione osteoclasti) e della neo-apposizione (attivazione osteoblasti). La struttura porosa del materiale permette la rivascolarizzazione (angiogenesi)³⁸, lo sviluppo di fibre collagene, la migrazione di cellule osteogenetiche con la mineralizzazione del tessuto. L'osso neo-formato ingloba le particelle di Bio-Oss® spongioso conferendo all'impianto resistenza e stabilità. In letteratura vi sono numerose documentazioni cliniche e pubblicazioni sull'idoneità del Bio-Oss® nel campo dell'ingegneria tessutale.

Le immagini al microscopio elettronico possono essere molto utili per verificare il grado di biomimetismo dei vari materiali: immagine al microscopio elettronico (fig.1-4 a scansione 50x, a trasmissione 100000x).

Anche dall'analisi mediante microscopia elettronica si può evidenziare la sorprendente somiglianza del Bio-Oss® e l'osso umano spongioso nella forma della struttura cristallina e della porosità. Osservazioni simili sono state fatte in altri studi condotti da Jarcho, Ganelles, Tracy, Heughebaert^{39, 40, 41, 42}. I cristalli di apatite che si formano tra i granuli di biomateriale hanno la tipica forma ad ago dei cristalli della componente minerale



Fig. 1: Osso umano: struttura trabecolare e porosità intercomunicante dell'osso spongioso.



Fig. 2: Osso umano: si evidenziano i minuscoli cristalli compatti di apatite naturale.



Fig. 3: Bio-Oss® spongioso: struttura trabecolare e porosità intercomunicante, evidente la somiglianza con l'osso spongioso naturale.

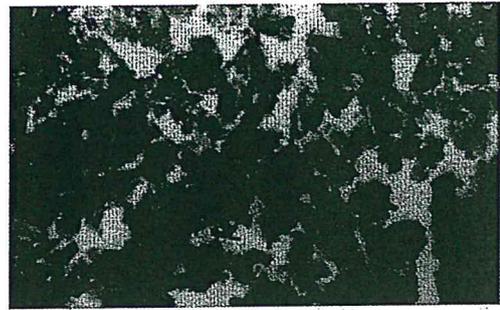


Fig. 4: Bio-Oss®: analogamente all'osso umano, Bio-Oss si compone di minuscoli cristalli compatti di apatite naturale.

L'esperienza dell'università di Verona ha creato un biomateriale ibrido

dell'osso. L'entità del riassorbimento di Bio-Oss® va di pari passo con la formazione di osso, così che ad un'iniziale diminuzione di volume dei granuli segue una stabilizzazione della dimensione delle particelle. Questa osservazione sperimentale suggerisce che la deposizione diretta di nuovo osso alla superficie del Bio-Oss® previene l'ulteriore dissoluzione del biomateriale. Il Bio-Oss® presentando la naturale struttura porosa dell'osso umano favorisce la rivascularizzazione per azione dei vasi ematici (angiogenesi) e l'infiltrazione degli osteoblasti, che migrano attraverso il sistema della struttura spongiosa. Le dimensioni dei pori, dell'ordine di grandezza di qualche centinaio di micron costituiscono un fattore determinante ai fini dell'integrazione di un innesto autologo nell'osso umano. Come per l'osso autologo le dimensioni dei pori, associati con la misura della superficie interna dei vari materiali sostituiti dell'osso, influenza in vivo il loro comportamento⁴³.

Per bone binding si intende la proprietà di indurre la formazione di uno strato di apatite biologica all'interfaccia determinando un contatto diretto tra l'osso e il biomateriale⁴⁴. I biomateriali vanno incontro ad idrolisi con liberazione di ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} una volta innestati nel tessuto ricevente, ciò non significa che queste sostanze vadano incontro a riassorbimento completo: la dissoluzione dei cristalli di apatite, libera ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} nei liquidi biologici compresi tra i granuli di

Bio-Oss® aumentando così il livello di saturazione di questi ioni e causandone la riprecipitazione. I granuli di fosfato di calcio così precipitati fungono da nuclei di accrescimento per la formazione di cristalli di apatite che incorporano anche altri ioni quali carbonato e magnesio, nonché proteine organiche presenti nei liquidi biologici. Bio-Oss® si integra completamente e partecipa ai processi di rimodellamento dell'osso rallentandone il riassorbimento⁴⁵.

Tra i biomateriali ibridi l'esperienza dell'università di Verona ha permesso di creare per la prima volta un nuovo modello sperimentale che implica osteoblasti originari da ossa mascellari e mandibolari di uomo adulto e cresciuti su matrice 3D di osso bovino deproteinizzato per sviluppare un biomateriale ibrido³. A Verona i primi studi sperimentali sul comportamento delle cellule osteoblastiche (controllo dell'induzione, produzione, mantenimento e rimodellamento dell'osso) sono stati fatti sui topi. Si è cercato quindi di trasferire i risultati ottenuti con le cellule murine alle cellule umane. Sono stati quindi coltivati in vitro (colture tissutali) per la prima volta osteoblasti originari da ossa mascellari e mandibolari di uomo adulto e caratterizzate secondo definiti parametri (attività dell'ALP, sintesi di collagene di tipo I, produzione di proteine tipiche dell'osso come l'osteocalcina, la risposta ad ormoni ed a fattori di crescita, mineralizzazione della matrice extracellulare)^{3, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52}. La fatti-

I materiali ceramici osteoconduttivi hanno un ruolo essenzialmente osteoconduttivo

bilità di questi materiali ibridi doveva però essere supportata da valide dimostrazioni in vitro sulla biotollerabilità della matrice tridimensionale, sulla sua proprietà di favorire la proliferazione cellulare e di mantenere il fenotipo osteoblastico nel tempo^{48,49}. L'elevata citocompatibilità dimostrata dal Bio-Oss® per clusters cellulari specifici ha indotto poi gli Autori ad intraprendere uno studio sperimentale in vivo per valutare l'effettiva applicabilità clinica di un innesto ibrido composto da Bio-Oss® e cellule osteoblasto simili⁴⁴.

Osso alloplastico

Materiali ceramici osteoconduttivi

Sono materiali molto utilizzati negli ultimi anni sia in chirurgia orale e maxillo-facciale che in chirurgia ortopedica e come innesti ossei hanno un ruolo essenzialmente osteoconduttivo: possono fungere sia da impalcatura (scaffold o framework) sia hanno diversi gradi di riassorbibilità a seconda del biomateriale considerato: principalmente utilizzati sono il fosfato tricalcico (TCP), il calcio fosfato bifasico (BCP), le idrossiapatiti (HA), il solfato di calcio (CS) ed altri composti calcio-fosfatici.

I primi studi sul fosfato tricalcico (TCP) nelle sue fasi a e b furono fatti agli inizi degli anni Settanta^{53,54} e da questi emerse la capacità di questo materiale di riassorbirsi quando impiegato come materiale sostitutivo dell'osso. Nella fase b esso viene completamente riassorbito e sostituito da tessuto osteoide neoformato in un tempo variabile compreso tra 6 e 20 mesi, trasformandosi in un materiale idoneo come osteoconduttore⁵⁵. Nel 1972 Driskell⁵⁶ propose per primo una forma ceramizzata di fosfato tricalcico come sostituto osseo in difetti post-traumatici oro-maxillo-facciali. Il TCP è un materiale riassorbibile tuttavia la biodegradazione di questo non risulta regolare (57, 58), infatti il volume di osso neoformato è sempre inferiore al volume di TCP riassorbibile (il biomateriale si riassorbe se il fosfato tricalcico, in presenza dei liquidi

organici, si trasforma in fosfato monocalcico solubile). Per tale ragione il TCP viene impiegato clinicamente come materiale aggiuntivo in combinazione con sostituti ossei meno riassorbibili o come expander per innesti di osso autologo.

Coraini⁵⁵ utilizzano b-Tcp (Cerasorb, Curasan Pharma GmbH) in grandi rialzi di seno mascellare, per rigenerazioni verticali o orizzontali, difetti infraossei e delle forcazioni insieme a spongiosa autologa ed a membrane riassorbibili Piattelli⁵⁹ in uno studio utilizza una ceramica di calcio fosfato bifasico (BCP) composto per il 50% di idrossiapatite e 50% di fosfato beta tricalcico per riempire un difetto osseo e conclude con la biocompatibilità e l'osteoconduttività di questo materiale^{60,61}.

Più recentemente la ricerca si è orientata inoltre sulle idrossiapatiti (HA).

Immagine al microscopio elettronico di HA: (fig. 5, a scansione 50x; fig. 6 a trasmissione 100000x).



Fig. 5: Idrossiapatite: a differenza dell'osso umano presenta micro e macro porosità rarefatte e un'assenza assoluta di struttura trabecolare.



Fig. 6: Idrossiapatite: a differenza dell'osso umano o del Bio-Oss®, l'HA si compone di cristalli di grosse dimensioni e di forma irregolare.

Più recentemente la ricerca si è orientata sulle idrossiapatiti (HA)

Tra i coralli utilizzati in rigenerazione ossea vi è inoltre il Biocoral

Chiroff^{62, 63, 64} per primo identifica l'analogia strutturale tra i coralli marini e l'osso midollare e corticale, suggerendone quindi l'utilizzo come sostituto osseo nell'uomo (Tab. 2).

L'idrossiapatite $Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$ nella sua forma naturale, estratta dai coralli marini, è molto porosa; viceversa le forme sintetiche sono ceramiche la cui porosità e solubilità chimica sono assai ridotte e possono essere controllate alla produzione^{60, 65}; essa infatti consta di un denso materiale ceramico poroso o non poroso, biocompatibile, ed è commercializzata in vari formati⁶⁶.

Tra gli altri biomateriali utilizzati vi è il solfato di calcio (CS) che è un materiale ben tollerato, biodegradabile ed osteoconduttivo

Una fluoro-idrossiapatite porosa (FHA) utilizzata è il Frios Aligpore sia per innesti ossei che per rialzo di seno mascellare^{67, 68}. Negli ultimi anni è stata introdotta una nuova miscela composta di HA sintetica riassorbibile insieme a collagene di tipo I di derivazione equina ed a condroitin solfato (Biostite®, Vebas s.r.l.)⁶⁹. Maiorana⁷⁰ ha comparato in rialzi di seno l'utilizzo di Biostite® vs Bio-Oss® in uno studio clinico e radiologico con follow-up a quattro anni: i risultati per i due biomateriali erano simili. Scabbia⁷¹ studia Biostite® e Bio-Oss® nel trattamento di difetti profondi intraossei in pazienti parodontopatici e riporta un miglioramento clinicamente e statisticamente significativo nel livello di attacco clinico con riduzione del sondaggio sia clinicamente che radiograficamente. Rebaudi⁷² in uno studio cli-

nico ed istologico utilizza Biostite® intorno ad impianti posizionati in siti post-estrattivi.

Tra i coralli utilizzati in rigenerazione ossea vi è inoltre il Biocoral il quale è costituito soprattutto da carbonato di calcio sotto forma di aragonite (97-98%), stronzio, fluoruro, magnesio, sodio e potassio. Possiede una porosità maggiore del 45%, con pori di diametro 150 mm. circa.

Yukna⁷³ pubblica un follow up a cinque anni su sedici pazienti trattati con Biocoral in difetti ossei parodontali con risultati favorevoli. Piattelli⁷⁴ studia clinicamente ed istologicamente particelle di Biocoral gel le quali risultano essere circondate da osso maturo al momento della riapertura. Fricain⁷⁵ analizza l'influenza della struttura di tre tipi di corallo (porites astreoides, montastrea annularis and dichocoenia stokesi), impiantati in siti sottocutanei, sulla cinetica del loro riassorbimento e conclude che questa dipende dal tempo in cui l'innesto rimane in sede e dalla porosità stessa del materiale. Tra gli altri biomateriali utilizzati vi è il solfato di calcio (CS) che è un materiale ben tollerato, biodegradabile ed osteoconduttivo. Esso può essere utilizzato in siti post-estrattivi, per trattare deiscenze e fenestrazioni, in aumenti del seno mascellare, nel riempimento di cavità cistiche, in chirurgia endodontica e nel trattamento di difetti parodontali in associazione a membrane⁷⁶. Stocchi⁷⁷ studia

| | Osso Spugnoso umano | Idrossiapatite |
|------------------------------|---------------------|----------------|
| Area superficie interna (nm) | 50 - 90 | 4 |
| Porosità totale (%) | 60 | 3 - 30 |
| Dimensione Cristalli (nm) | 10 - 50 | 500 - 100000 |
| Indice Ca/P | 2.03 | 1.62 |

Tab. 2.

Tra i biomateriali ibridi abbiamo il Pep-Gen P-15

L'angiogenesi su conigli utilizzando solfato di calcio (SurgiPlaster) in difetti ossei e riscontra un aumento della densità microvascolare (MVD) nei siti trattati. Orsini⁷⁸ tratta difetti parodontali intraossei con solfato di calcio ed osso autologo ottenendo buoni risultati⁷⁹.

Tra i biomateriali ibridi abbiamo il Pep-Gen P-15 che è una nuova combinazione di matrice di idrossiapatite derivata da osso bovino naturale anorganico (ABM), sul quale è adsorbito un peptide sintetico (P-15) capace di legare cellule. L'idrossiapatite porosa, derivata dall'osso bovino, ha pori di dimensioni di 250 - 420 nm e la matrice con il peptide emula le proprietà del collagene nel promuovere il legame, la migrazione e la differenziazione cellulare. Turhani⁸⁰ pubblica uno studio in vitro su tale materiale nel quale ne conferma la possibilità di utilizzo in campo oro-maxillo-facciale.

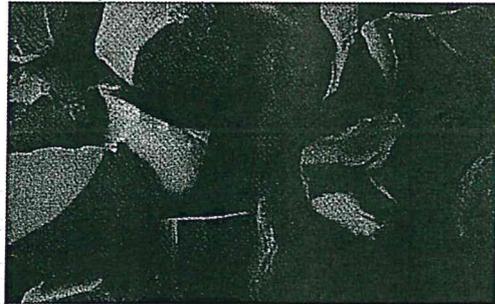


Fig. 7: Biovetro: particelle di sagoma irregolare. Appare evidente l'assenza di struttura trabecolare e di porosità.

Tra gli altri materiali sintetici riassorbibili vi sono: i polimeri di acido polilattico e poliglicolico ed i biovetri (BV)



Fig. 8: Biovetro: voluminose particelle di forma irregolare amalgamate a frammenti di più piccole dimensioni (40000x).

Altri materiali alloplastici osteoconduttivi.

Tra gli altri materiali sintetici riassorbibili utilizzati in parodontologia ed implantologia vi sono: i polimeri di acido polilattico e poliglicolico ed i biovetri (BV). Tra i polimeri di acido polilattico e poliglicolico, il Fisiograft è un biomateriale che viene degradato nel giro di 50-60 giorni; una valutazione della biocompatibilità di tale materiale per l'utilizzo in parodontologia ed implantologia è stata fatta da Gatti⁸¹. Zaffe⁸² ha pubblicato uno studio istologico su rialzi di seno in cui si utilizzava Fisiograft e Bio-Oss[®]: la rigenerazione ossea era stata soddisfacente anche in siti in cui era stato posto Fisiograft da solo. Serino⁸³ presenta uno studio clinico ed istologico con Fisiograft utilizzato in siti post-estrattivi per la riduzione del riassorbimento osseo durante il fisiologico rimodellamento osseo dell'alveolo.

Inoltre vi sono i biovetri (BV) che sono costituiti da particolari granuli di vetro attivo ed amorfo, di 300-350 nm di diametro, costituiti a loro volta dal 45% in SiO₂, dal 24,5% in CaO, dal 24,5% in NaO₂ e dal 6% in P₂O₅. Il BV diventa adesivo dopo il contatto col sangue e ciò ne facilita la manipolazione; può quindi essere applicato nel sito del difetto direttamente o precedentemente mischiato col sangue del paziente⁸⁴. Piattelli⁸⁵ in uno studio innesta su tibia di coniglio particelle di bioglass per colmare difetti ossei e conclude che i biovetri sono materiali altamente osteoconduttivi. Camargo⁸⁶ utilizza come riempitivi dell'alveolo post-estrattivo biovetri e solfato di calcio per preservare la dimensione orizzontale delle creste alveolari. Tadjoedin⁸⁷ in uno studio utilizza biovetri insieme ad osso autologo, in rapporto 1:1, in rialzi di seno mascellare ed a distanza di 16 mesi ottiene la totale sostituzione dei biovetri con osso neoformato.

Immagine al microscopio elettronico di biovetro: (fig.7, a scansione 50x, fig. 8 a trasmissione 100000x).

Discussione

La nuova frontiera è l'ingegneria tissutale su cui attualmente vertono la maggior parte dei lavori scientifici

Le limitazioni riguardanti l'utilizzo di osso autologo come materiale da innesto possono essere compensate impiegando i diversi sostituti ossei che si trovano in commercio: sono stati riportati moltissimi studi clinici su tali biomateriali e sull'osteconduttività di questi.

La nuova frontiera è l'ingegneria tissutale su cui attualmente vertono la maggior parte dei lavori scientifici. Fino ad ora nella casistica della Scuola di Verona si è utilizzato in particolar modo il Bio-Oss®, da solo o, in numero limitato di casi sperimentali, come biomateriale ibrido in associazione a cellule osteogeniche, perchè è un biomateriale altamente osteoattivo, è integrabile con l'osso autologo, rientra nel processo fisiologico del rimodellamento osseo e garantisce l'osteointegrazione degli impianti dentali^{3, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94}.

Contatti

Dott. Daniele De Santis
 Clinica Odontoiatrica e di Chirurgia Maxillo-Facciale
 Direttore Prof. P.F. Nocini
 Università degli studi di Verona
 Dipartimento di Scienze Morfologico Biomediche Policlinico G.B. Rossi,
 piazzale L. Scuro, 1
 37134 Verona

Bibliografia:

3. **Nocini P.F., Chiarini L. & De Santis D.:** Trattato di chirurgia pre-protetica e di ingegneria tissutale. Edizioni Martina, Bologna, 2005.

15. **Noumbissi S.S., Lozada J.L., Boyne P.J., Rohrer M.D., Clem D., Kim J.S. & Prasad H.:** (2005) Clinical, histologic, and histomorphometric evaluation of mineralized solvent-dehydrated bone allograft (Puros) in human maxillary sinus grafts. *J Oral Impl.*31(4):171-9.

16. **Van den Bergh J.P.A., ten Bruggenkate C.M., Krekeler G., Tuinzing D.B.:** (2000) Maxillary sinus floor elevation and grafting with human demineralized freeze dried bone. *Clin Oral Impl Res* 2000 11:487-493.

17. **Minichetti J.C., D'Amore J.C., Hong A.Y. & Cleveland D.B.:** (2004) Human histologic analysis of mineralized bone allograft (Puros) placement before implant surgery. *J Oral Implantol.*;30(2):74-82.

18. **Petrungaro P.S., Amar S.:** Localized ridge augmentation with allogenic block grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. *Impl. Dent.* 2005 Jun;14(2):139-48.

19. **Peleg M.:** Using allogenic block grafts to augment the alveolar ridge. *Dent Implantol Update.* 2004 Dec;15(12):89-94.

20. **Lyford R.H., Mills M.P., Knapp C.I., Scheyer E.T. & Mellonig J.T.:** (2003) Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. *Int J Perio Res Dent.* Oct;23(5):417-25.

21. **Leonetti J.A. & Koup R.:** (2003) Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent.*;12(3):217-26.

22. **Feuille F., Knapp C.I., Brunsvold M.A. & Mellonig J.T.:** (2003) Clinical and histologic evaluation of bone-replacement grafts in the treatment of localized alveolar ridge defects. Part 1: Mineralized freeze-dried bone allograft. *Int J Perio Rest Dent.* Feb;23(1):29-35. Berglundh T. & Lindhe J. (1997) Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®. *Clin. Oral Impl. Res.* 8: 117-124.

23. **Piattelli A., Scarano A. & Piattelli M.:** (1998) Microscopic and histochemical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in association with implant placement: a case report. *Int J Perio Rest Dent.* Aug;18(4):355-61.

24. **Simion M., Jovanovic S.A., Trisi P., Scarano A., Piattelli A.:** (1998) Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *Int J Perio Rest Dent.* Feb;18(1):8-23.

25. **Simion M., Trisi P. & Piattelli A.:** (1996) Guided bone regeneration with e-PTFE membrane associated with DFDB graft: histological and histochemical analysis in a human implant retrieved after 4 years of loading. *Int J Perio Rest Dent.* Aug;16(4):339-47.

26. **Piattelli A., Scarano A., Corigliano M. & Piattelli M.:** (1996) Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials.* Jun;17(11):1127-31.

27. **Donath K. & Piattelli A.:** Bone tissue reactions to demineralized freeze-dried bone in conjunction with e-PTFE barrier membranes in man. (1996) *Eur J Oral Sci.* Apr;104(2 (Pt 1):96-101.

28. Rose L.F. & Rosemberg E.: (2001) Bone graft ang growth and differentiation factors for regenerative therapy: a review. *Pract. Proced. Aesthet. Dent.* 13(9):725-734.
29. Livingston T, Ducheyne P & Garino J.: (2002) In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* Oct;62(1):1-13.
30. Hammerle Ch.H.F. & Lang N.P.: (2001) Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin. Oral Impl. Res.* 12: 9-18.
31. Valentini P, Abensur D., Wenz B., Peetz M. & Schenk R.: (2000) Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss®): A study on 15 patients. *Int J Perio Rest Dent* 20:245-252.
32. Camelo M., Nevins M.L., Schenk R.K., Simion M., Rasperini G., Lynch S.E. & Nevins M.: (1998) Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss® and Bio-Gide. *Int. J. Perio. Rest. Dent.* 18: 321-331.
33. Hammerle Ch.H.F., Chiantella G.C., Karring T. & Lang N.P.: (1998) The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around exposed implants threads. *Clin. Oral Impl. Res.* 9: 151-162.
34. Valentini P., Abensur D., Densari D., Graziani J.N. & Hammerl, Ch.: (1998) Histological evaluation of Bio-Oss® in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. *Clin Oral Impl Res* 9: 59-64.
35. Hollinger J.O. & Seyfer A.E.: (1994) Bioactive factors and biosynthetic materials in bone grafting. *Clin Plast Surg.* Jul;21(3):415-8. Review.
36. Wenz B., Oesch B. & Horst M.: (2001) Analysis of the risk of transmitting bovine Spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 22: 1599-1606.
37. Benke D., Olah A. & Mohler H.: (2001) Bio-Oss® bone substitute contains carbonate but fails to display protein including TGF. *Biomaterials* 22: 1005-1012.
38. Piattelli A., Degidi M., Di Stefano D.A., Rubini C., Fioroni M. & Strocchi R.: (2002) Microvessel density in alveolar ridge regeneration with autologous and alloplastic bone. *Impl Dent.* 11(4):370-5.
39. Jarcho M., Kay J.F. & Doremus R.H.: (1976) Tissue, cellular and subcellular events at bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J. Bioeng* 1:79.
40. Tracy B.M. & Doremus R.H.: (1984) Direct electron microscopy studies of the bone hydroxylapatite interface. *J Biomed Mater Res.* 18: 719.
41. Ganelles J., Listgarten M.A. & Evian C.I.: (1986) Ultrastructure of durapatite periodontal tissue in human intrabony defects. *J. Perio.* 57: 133.
42. Heughebaert M., Le Geros R.Z. Gineste M. & Gilhem A.: (1988) Hidroxyapatite (HA) ceramis implanted in non-bone forming sites. Physiochemical characterization. *Biomed. Mater. Res.* 22:257.
43. Weibrich G., Trettin R., Gnoth S.H., Gotz H & Wagner W.: (2000) Analysis of the size of the specific surface area of bone regeneration materials by gas adsorption. *Mund Kiefer Gesichts chir* 156:1-5.
44. De Santis D., Dolci M., Barbaglio A., D'Agostino A. & Nocini P.F.: (1996) La formazione dello strato di apatite biologica: L'essenza dell'interfaccia tra tessuto osseo e i materiali bioattivi. *Annali di Stomatologia* 2.
45. Kloss F., Schlegel K.A., Schultze-Mosgau S., Wiltfang J. & Neukam F.W.: (2001) Clinical and histological findings in sinus augmentations using autogenous and xenogenous materials. *Zeitschrift fur Zahnarztliche Implantologie* 14. supplement.
46. De Santis D., Guerriero C., Nocini P.F., Ungersbock A., Richards G., Gotte P. & Armato U.: (1996) Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxylapatite discs. *J. Mat. Science: Materials in Medicine.* 7:21-28.
47. De Santis D., Nocini P.F., Orio S., Dolci M., Barbaglio A., Guerriero C.: (1996) Utilizzo di un materiale ibrido a base di osso eterologo bovino (Bio-Oss) e osteoblasti umani adulti. *Quaderni di odontostomatologia* 1:59-66.
48. De Santis D., Guerriero C., Nocini P.F. & Armato U.: (1996) Culture of adult human jaw bone cells on heterologous bovine cancellous bone. *Abstract Book-Fifth World Biomaterials Congress, May 29-June, Toronto, Canada.*
49. De Santis D., Nocini P.F., Armato U. & Gotte P.: (2001) Tissue engineering with autologous human osteoblast cells (AHOC) and deproteinized natural bone mineral (DNBM) matrices: a clinical case. *Zeitschrift fur Zahnarztliche Implantologie.*
50. Guerriero C., De Santis D., Nocini P.F., Gotte P. & Armato U.: (1995) Tissue culture of human osteoblasts isolated from jaw bones. *It. J. Anat. Embryol.* 100:83-93.
51. Guerriero C., De Santis D., Nocini P.F., Gotte P. & Armato U.: (1995) Synergistic differentiative actions of A and D vitamins and Dexamethasone in cultured normal adult osteoblasts from jaw bones. *J. Exper. Clin. Cancer Res. Suppl.* 14(1):47-48.

52. De Santis D., Guerriero C., Armato U., Gotte P., Dolci M. & Nocini P.F.: (1995) Effetto della proteina morfogenetica ossea tipo 3 sulla differenziazione di colture di osteoblasti umani adulti ottenuti da espunti di ossa mascellari. *Chirurgia Maxillofac.* 441-445.
53. Bhaskar S.N., Brady J.M., Getter L., Grower M.F. & Driskell T.: (1971) Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* Aug;32(2):336-46.
54. Bhaskar S.N., Cutright D.E., Knapp M.J., Beasley J.D., Perez B. & Driskell T.D.: (1971) Tissue reaction to intrabony ceramic implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* Feb;31(2):282-9.
55. Coraini C., Siervo P., Giardini R. & Siervo S.: (2002) Fosfato tricalcico b come sostituto sintetico dell'osso. Il dentista moderno *Ott*:69-80.
56. Driskell T.D., O'Hara M.J., Sheets H.D. Jr, Greene G.W. Jr, Natiella J.R. & Armitage J.: (1972) Development of ceramic and ceramic composite devices for maxillofacial applications. *J Biomed Mater Res.* 6(1):345-61.
57. Klein C.P., de Groot K., Driessen A.A. & van der Lubbe H.B.: (1986) A comparative study of different beta-whitlockite ceramics in rabbit cortical bone with regard to their biodegradation behaviour. *Biomaterials.* Mar;7(2):144-6.
58. Winter M., Griss P., de Groot K., Tagai H., Heimke G., von Dijk H.J. & Sawai K.: (1981) Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* Jul;2(3):159-60.
59. Piattelli A., Scarano A. & Mangano C.: (1996) Clinical and histologic aspects of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) used in connection with implant placement. *Biomaterials.* Sep;17(18):1767-70.
60. Habibovic P., Yuan H., van der Valk C.M., Meijer G., van Blitterswijk C.A. & de Groot K.: (2005) 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials.* Jun;26(17):3565-75.
61. Schopper C., Ziya-Ghazvini F., Goriwoda W., Moser D., Wanschitz F., Spassova E., Lagogiannis G., Auterith A. & Ewers R.: (2005) HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation—a long-term histological study. *J Biomed Mater Res. B Appl Biomater.* Jul;74(1):458-67.
62. Chiroff R.T., White R.A., White E.W., Weber J.N. & Roy D.: (1977) The restoration of the articular surfaces overlying Replamineform porous biomaterials. *J Biomed Mater Res.* Mar;11(2):165-78.
63. Chiroff R.T., White E.W., Weber K.N. & Roy D.M.: (1975) Tissue ingrowth of Replamineform implants. *J Biomed Mater Res.* Jul;9(4):29-45.
64. White E.W., Weber J.N., Roy D.M., Owen E.L., Chiroff R.T. & White R.A.: (1975) Replamineform porous biomaterials for hard tissue implant applications. *J Biomed Mater Res.* Jul;9(4):23-7.
65. Piattelli A.: (2003) Biomateriali utilizzati in rigenerazione ossea: risultati istologici. *Implantologia orale* 4:77-80.
66. Chiarini L., Tanza D., Cantoni E. & Ferronato G.: (1992) Le atrofie totali della cresta alveolare mandibolare. Nuova proposta terapeutica (uso dell'espansore tissutale) e presentazione di un caso clinico. *Minerva Stomatologica* 41:193-202.
67. Schopper C., Moser D., Sabbas A., Lagogiannis G., Spassova E., Konig F., Donath K. & Ewers R.: (2003) The fluoro-hydroxyapatite (FHA) FRIOS Algiopore is a suitable biomaterial for the reconstruction of severely atrophic human maxillae. *Clin Oral Impl. Res.* Dec;14(6):743-9.
68. Schopper C., Moser D., Wanschitz F., Watzinger F., Lagogiannis G., Spassova E. & Ewers R.: (1999) Histomorphologic findings on human bone samples six months after bone augmentation of the maxillary sinus with Algiopore. *J Long Term Eff Med Impl.* 9(3):203-13.
69. Serre C.M., Papillard M., Chavassieux P., Boivin G.: (1993) In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. *Biomaterials.* 14(2):97-106.
70. Maiorana C., Sigurta D., Mirandola A., Garlini G. & Santoro F.: (2005) Bone resorption around dental implants placed in grafted sinuses: clinical and radiologic follow-up after up to 4 years. *Int J Oral Maxillofac Impl.* Mar-Apr;20(2):261-6.
71. Scabbia A. & Trombelli L.: (2004) A comparative study on the use of a HA/collagen/chondroitin sulphate biomaterial (Biostite) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-Oss) in the treatment of deep intraosseous defects. *J Clin Periodontol.* May;31(5):348-55.
72. Rebaudi A., Silvestrini P. & Trisi P.: (2003) Use of a resorbable hydroxyapatite-collagen chondroitin sulfate material on immediate postextraction sites: a clinical and histologic study. *Int J Perio. Rest. Dent.* Aug;23(4):371-9.
73. Yukna R.A., Yukna C.N.: (1998) A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (BIOCORAL) bone replacement grafts in infrabony defects. *J Clin Periodontol.* Dec;25(12):1036-40.

Da 74 a 94 su richiesta.