

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Scuola di Medicina

Dipartimento di Scienze Chirurgiche

Corso di Laurea Specialistica in Odontoiatria e Protesi

Dentaria



TESI DI LAUREA

*Innesto di Tessuto Connettivo Autologo Proveniente
dalla Polpa Dentaria nella Rigenerazione Tissutale
Guidata dei Difetti Infraossei.*

RELATORE

Chiar.mo Prof. Mario Aimetti

CANDIDATO

Mara Noemi Gamba

Ai miei genitori.

INDICE

<i>Capitolo</i>	<i>Pagina</i>
Introduzione	4
Materiali e metodi	12
Risultati	22
Discussione	25
Conclusioni	28
Bibliografia	29

INTRODUZIONE

La parodontite è un patologia infiammatoria cronica causata dalla presenza di placca batterica che in individui geneticamente suscettibili determina la migrazione apicale dell'epitelio giunzionale, la perdita di attacco connettivale e il riassorbimento dell'osso alveolare. La prevalenza della parodontite, utilizzando come popolazione di riferimento quella residente a Torino al 1 gennaio del 2010 (dati ISTAT), è globalmente intorno al 75.72% (95% CI 72.25-79.18%). Se si considera la forma di moderata gravità interessa il 40.78% (95% CI 36.83-44.73%), mentre nella forma severa colpisce il 34.94% (95% CI 31.23-38.65%) della popolazione torinese⁽¹⁾.

Se non trattata, la parodontite può portare alla perdita precoce degli elementi dentali. La distruzione parodontale può portare all'insorgenza di 3 tipi di difetti ossei: sovraossei, infraossei e interradicolari. I difetti sovraossei sono quelli in cui la base della tasca è coronale rispetto alla cresta alveolare; i difetti infraossei si distinguono per la collocazione apicale della base della tasca rispetto alla cresta alveolare residua e si classificano a loro volta in difetti infraossei e crateri. I difetti infraossei sono difetti ossei che coinvolgono solo un elemento dentale, mentre nei crateri il difetto interessa in misura analoga due superfici radicolari adiacenti⁽²⁾. I difetti infraossei sono classificati in base alla loro morfologia in base alle pareti ossee residue in difetti ad 1, 2 e 3 pareti.

Dopo terapia parodontale non chirurgica possono residuare tasche maggiori di 4 mm che risultano inaccessibili alle manovre di igiene orale domiciliare. Al fine di correggere questi difetti anatomici può rendersi necessaria l'esecuzione di tecniche chirurgiche che mirino all'ottenimento di un solco gengivale fisiologico.

Quando possibile la terapia chirurgica deve puntare al ripristino del tessuto perduto, con la formazione di nuovo cemento radicolare, attacco connettivale ed osso alveolare.⁽³⁾

La ricerca parodontale ha portato allo sviluppo di diverse tecniche rigenerative come la rigenerazione tissutale guidata (GTR), gli innesti ossei (BG), l'utilizzo di fattori di

crescita come il PDGF, derivati della matrice dello smalto e, più recentemente, le cellule staminali.

La **GTR** è una tecnica in grado di rigenerare l'attacco connettivale, l'osso alveolare e il cemento radicolare nei difetti parodontali. La tecnica si basa sull'utilizzo di una barriera meccanica, ovvero una membrana riassorbibile o non riassorbibile, che previene o ritarda la migrazione apicale dell'epitelio gengivale e consente alle cellule del legamento parodontale e al tessuto osseo di ripopolare la superficie radicolare durante la guarigione e di stabilizzare il coagulo.

Una recente revisione sistematica ha dimostrato che la GTR migliora il livello di attacco clinico, riduce la profondità di sondaggio e presenta risultati migliori con minore recessione gengivale e maggiore entità di rigenerazione ossea rispetto all'open flap debriment (OFD).⁽⁴⁾

Le varie membrane utilizzate nella tecnica GTR (politetrafluoroetilene espanso, derivati del collagene o polimeri bioassorbibili) non hanno determinato risultati differenti dal punto di vista statistico.⁽⁵⁾

Nonostante l'efficacia comprovata della tecnica vi sono alcuni limiti. Nel caso si utilizzino membrane non riassorbibili è necessario un secondo intervento chirurgico per rimuovere la membrana e questo aumenta il rischio di avere una contrazione dei tessuti. Un altro limite è il rischio di esposizione della membrana con conseguente contaminazione batterica, riduzione della rigenerazione ed aumento della recessione.

La rigenerazione tramite **EMD** si basa sull'utilizzo di proteine della matrice dello smalto. La matrice dello smalto è costituita da numerose proteine di cui il 90 % sono amelogenine, le quali inducono la formazione dell'attacco parodontale durante la formazione della radice. In chirurgia parodontale viene utilizzato l'Emdogain che è costituito da EMD di derivazione suina ed una soluzione veicolo di Alginato di Glicole Propilenico (PGA), le due parti sono miscelate prima dell'uso e si ottiene un composto in fase gel. È interessante notare come la soluzione veicolo PGA ha un effetto antimicrobico nei confronti dei patogeni parodontali.^(6,7,8)

Studi hanno dimostrato che l'EMD, nella rigenerazione parodontale dei difetti infraossei, presenta differenze statisticamente significative nell'aumento del livello di attacco clinico e nel ridurre la profondità di tasca rispetto alla tecnica Open Flap Debridement, al solo placebo o al condizionamento con EDTA al 24%.⁽⁹⁾

A causa della consistenza simil-gel, l'EMD possiede limitate capacità di mantenimento di spazio con conseguente rischio di collasso in difetti poco contenitivi. Trombelli et al. hanno dimostrato che le procedure rigenerative basate sulla preservazione di tessuto sovracrestale interprossimale e l'applicazione di EMD con un riempitivo portavano a dei buoni risultati clinici in termini di guadagno di tessuti duri e molli in difetti parodontali infraossei.⁽¹⁰⁾

È stato anche proposto l'utilizzo di EMD insieme alla tecnica GTR, tuttavia è stato dimostrato che non vi sono benefici aggiuntivi nell'associare le due tecniche.⁽¹¹⁾

Inoltre, gli studi che associavano all'EMD membrane non riassorbibili presentavano un'alta incidenza di esposizione della membrana che comprometteva l'intero trattamento.⁽¹²⁾

Al contrario, l'associazione di EMD con sostituti ossei, come l'osso bovino, ha il potenziale di aumentare i risultati se paragonato al solo EMD, in termini di livello di attacco clinico e riempimento osseo.^(13,14)

L'utilizzo di materiali di **innesto** per la rigenerazione parodontale e ossea si basa sulle loro proprietà di mantenitori di spazio e di mantenere stabile il coagulo. Sono stati proposti diversi tipi di materiali: osso autologo, osso omologo (DFDBA, FDBA), osso eterologo o di origine animale e materiali sintetici (β -fosfato tricalcico, idrossiapatite).

L'osso autologo è il materiale di prima scelta per le sue capacità osteogeniche, osteoconduttive e osteoinduttive.⁽¹⁵⁾ Comparato con l'osso xenogenico, l'osso autologo sembra accelerare il processo di guarigione in difetti della cresta mascellare.⁽¹⁶⁾

L'osso autologo, tuttavia, necessita di un secondo sito di intervento per prelevare il materiale dal sito donatore e, sfortunatamente, va incontro durante la guarigione ad un importante processo di rimodellamento e riduzione volumetrica.⁽¹⁷⁾

È stato proposto l'utilizzo di membrane al fine di ridurre il riassorbimento osseo durante la guarigione^(18,19) ma Gielkens et al.⁽¹⁸⁾ hanno osservato che sia le membrane riassorbibili che non riassorbibili non controllavano il riassorbimento dell'innesto osseo, ma erano utili per prevenirne la contaminazione batterica.

Il grado di riassorbimento dei sostituti ossei invece è piuttosto limitato.⁽²⁰⁾

Diversi studi hanno dimostrato che il rimodellamento di innesti xenogenici (Bio-Oss, Geistlich, Wolhusen, Switzerland) continua, in parte, anche diversi anni dopo il trattamento.^(21,22,23) Inoltre, alcuni studi hanno riportato che i materiali xenogenici possono indurre l'attivazione di un processo infiammatorio e immunologico che può ritardare la formazione di nuovo osso nell'area innestata.^(24,25)

Nella rigenerazione parodontale l'osso autologo ha dimostrato grandi capacità riparative⁽²⁶⁾, tuttavia la tendenza all'utilizzo di approcci chirurgici minimamente invasivi pone dei limiti nell'utilizzo di tali materiali.

Le **tecniche chirurgiche minimamente invasive** sono così definite per la ridotta estensione del lembo rispetto alle tecniche tradizionali con l'obiettivo di ridurre la recessione gengivale, il trauma tissutale e mantenere la stabilità del coagulo, essenziale per la rigenerazione del tessuto parodontale.

Nel 1985 Takei et al. proposero una tecnica a lembo con preservazione della papilla interdentale che permetteva una chiusura primaria del lembo.⁽²⁷⁾

Sono stati successivamente proposti lembi minimamente invasivi quali MIST (minimal invasive surgical technique), M-MIST(modified minimally invasive surgical technique), SFA (single-flap approach)^(28,29,30) che, in associazione all'EMD, hanno portato a risultati migliori rispetto al solo coagulo nella rigenerazione di difetti infraossei.

Con questi approcci chirurgici, in associazione all'utilizzo del microscopio e di strumenti di microchirurgia, si è ottenuta una migliore guarigione per prima intenzione, un maggiore guadagno del livello di attacco clinico ed una minore recessione.⁽³¹⁾

Il corretto management dei tessuti molli permette dei miglioramenti sia clinici che radiografici quando vengono utilizzate tecniche minimamente invasive con o senza l'uso di biomateriali quali idrossiapatite con membrane, EMD e PDGF.^(32,33,34)

Negli ultimi anni la ricerca si sta indirizzando verso l'utilizzo di materiali in grado di accelerare i processi di guarigione delle ferite e aumentare l'apporto di cellule all'interno del coagulo in grado di differenziare in osso, cemento e legamento parodontale. Tali tecniche prevedono l'utilizzo di fattori di crescita quali BMP e PDGF e di cellule staminali.

Le BMP (bone morphogenetic proteins) sono molecole della famiglia del TGF- β in grado di indurre le cellule staminali mesenchimali dell'ospite a differenziare in senso condroblastico ed osteoblastico.⁽³⁵⁾

Recenti studi hanno utilizzato **BMP** ricombinanti umane e ne hanno determinato il potenziale nel correggere difetti infraossei, sovraossei, difetti delle biforcazioni e fenestrazioni.^(36,37,38,39,40,41) RhBMP-2, in associazione a una spugna di collagene o ePTFE, si è dimostrato efficace per il trattamento di difetti post-estrattivi.^(42,43,44)

È stato proposto anche l'utilizzo di **PDGF** per il trattamento di difetti parodontali. L'evidenza istologica di rigenerazione parodontale è stata riportata da studi su cani beagle.^(45,46)

È stato dimostrato che l'utilizzo di PDGF in associazione a DFDBA e β -TCP (fosfato beta-tricalcico) determina un significativo miglioramento clinico, radiografico e istologico se paragonato al solo DFDBA e β -TCP in difetti intraossei di moderata e severa gravità.⁽⁴⁷⁾

I recenti progressi nel campo dell'ingegneria tissutale hanno portato allo sviluppo di terapie geniche e cellulari. La terapia cellulare si basa sul concetto di apportare una fonte aggiuntiva di cellule nell'area di interesse con l'intento di utilizzarle come innesto o fattori di crescita. Sia le cellule somatiche che le cellule staminali possono essere utilizzate a tal fine. Le cellule somatiche possono essere prelevate, coltivate e innestate per stimolare la rigenerazione di nuovi tessuti.

Il vantaggio delle cellule staminali risiede nelle loro peculiari caratteristiche. Le **cellule staminali** sono cellule clonogeniche e indifferenziate le cui peculiarità

principali sono l'auto-rinnovamento e la capacità di dare origine a una o più linee cellulari tramite il loro differenziamento.⁽⁴⁸⁾

Sono state identificate popolazioni di cellule staminali in una grande quantità di tessuti e queste popolazioni differiscono per la loro capacità differenziativa. Ad oggi si possono riconoscere tre tipi di cellule staminali: cellule staminali embrionali pluripotenti in grado di differenziarsi in tutte le linee cellulari somatiche, cellule staminali adulte multipotenti che possiedono una capacità differenziativa più limitata e cellule staminali pluripotenti indotte.⁽⁴⁹⁾

Le prime cellule staminali adulte identificate furono quelle ematopoietiche isolate dal midollo osseo nel 1909 dall'istologo russo Alexander Maximov.⁽⁵⁰⁾

Nel 1970 Friedenstein isolò un'altra popolazione di cellule staminali dal midollo osseo denominate cellule staminali mesenchimali (MSCs) o simil fibroblasti formanti colonia (BMSC) che sono in grado di differenziare verso fenotipi connettivali.

Negli ultimi anni le MSCs sono state identificate in diversi tessuti del corpo umano oltre al midollo osseo come ad esempio il tessuto adiposo, cartilagine articolare, periostio, tessuto muscolare, fegato e pancreas.

Le cellule staminali mesenchimali sono state identificate anche in numerosi tessuti di derivazione dentale incluso il legamento parodontale (PDLSC) la polpa dentale (DPSC), i denti decidui esfoliati (SHED), la papilla dentale (SCAP) ed il follicolo dentale (DFPC).^(51,52,53,54,55)

Nel midollo osseo si possono trovare tre tipi cellulari: ematopoietico, endoteliale e stromale. Ci sono diversi studi che ne dimostrano la capacità di migliorare la rigenerazione parodontale. Tuttavia, la morbilità associata al prelievo midollare ne rende difficile l'utilizzo a tal fine. Le cellule staminali mesenchimali di origine dentale possono essere ottenute, invece, senza ricorrere a tecniche invasive quali appunto il prelievo dal midollo osseo.

Gronthos et al.⁽⁵²⁾ hanno dimostrato che le cellule staminali pulpari (DPSC) hanno caratteristiche simili a quelle del midollo osseo (BMSC) e presentano la capacità di rigenerare il complesso dentino-pulpare in vivo. Comparando DPSC con le cellule staminali midollari si è visto che il numero di cellule in attiva proliferazione, così

come la percentuale di cellule formanti colonia, è significativamente più alta nelle DPSC che nelle BMSC.

È stato dimostrato che le DPSC sono in grado di differenziare in tessuto osseo in vitro e in osso lamellare dopo essere state impiantate in ratti immunosoppressi.⁽⁵⁶⁾ Inoltre, è stato dimostrato che DPSC sono in grado di differenziare in senso odontogenico, neurogenico, adipogenico e miogenico.^(57,58,59)

Laino et al.⁽⁶⁰⁾ isolarono una sottopopolazione di cellule staminali stromali prelevate dalla polpa di elementi dentali permanenti (SBP-DPSCs) in grado di differenziare in cellule di derivazione mesenchimale e, in particolare, in osteoblasti. Queste cellule presentavano positività per i marcatori di staminalità CD34 e STRO-1 e il 100% presentava positività per HLA-1 e CD44 e un'elevata positività per RUNX-2 (70,48%) e osteocalcina (29,52%) che sono marker di differenziamento in senso osteoblastico.

Le SBP-DPSC producono osso, ma non dentina come dimostrato in vitro dai trascritti di RNAm che sono caratteristici per il tessuto osseo (osteocalcina, RUNX2, collagene tipo I, fosfatasi alcalina) e non esprimono la sialoproteina specifica del tessuto dentale.^(60,61)

Da non trascurare è come le cellule pulpari mostrino la capacità di interagire con biomateriali in grado di guidarne il percorso rigenerativo. Graziano et al.⁽⁶²⁾ hanno dimostrato che le SBP-DPSC presentano un comportamento diverso a seconda del substrato. È stato confrontato un substrato liscio con uno scaffold costituito da microcavità di superficie e si è visto che nel secondo caso si aveva una maggior liberazione di BMP-2 e VEGF e una elevata attività dell'ALP, fattori indispensabili per la formazione in vivo di osso adulto con adeguata vascolarizzazione.

Yamada et al. nel 2011⁽⁶³⁾ hanno dimostrato che, inserendo cellule staminali prelevate dalla polpa in difetti ossei creati chirurgicamente mediante l'estrazione di molari e premolari in modello animale, si ottiene una migliore guarigione grazie alla rigenerazione di osso maturo vascolarizzato. Lo studio dimostra, inoltre, che la formazione di nuovo osso è significativamente maggiore nel gruppo trattato con cellule staminali rispetto al gruppo controllo e al gruppo in cui viene utilizzato il PRP (platelet rich plasma).

Ji et al. hanno dimostrato, inoltre, che combinando le DPSC con idrossido di calcio si aveva maggiore reclutamento, migrazione e proliferazione delle cellule staminali prelevate dalla polpa con un'ottima rigenerazione ossea.⁽⁶⁴⁾

Le potenzialità delle DPSC nel riparare difetti infraossei umani sono state indagate in uno studio clinico di D'Aquino et al. Scopo dello studio era trattare difetti alveolari conseguenti all'estrazione di ottavi inclusi con cellule staminali prelevate dalla polpa degli stessi elementi dentali estratti, in associazione ad una spugna di collagene, al fine di limitare la successiva perdita di tessuto alveolare. I risultati supportano una rigenerazione ossea nei siti trattati.⁽⁶⁵⁾

Questi studi dimostrano che le cellule staminali prelevate dalla polpa possono svolgere un ruolo importante all'interno della rigenerazione parodontale.

Nel presente studio sono stati trattati consecutivamente otto pazienti allo scopo di valutare l'efficacia clinica di una nuova procedura parodontale rigenerativa basata sulla combinazione di cellule staminali della polpa, ottenute dall'avulsione di un elemento dentario che necessitava di estrazione, e un biomateriale a base di collagene. Il complesso costituito dal biomateriale e dalle cellule staminali della polpa costituisce il nostro materiale da innesto.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati consecutivamente 8 pazienti, di età compresa tra i 40 e i 70 anni afferenti al Reparto di Parodontologia, C.I.R. Dental School, Università degli Studi di Torino, nel periodo di tempo compreso tra febbraio 2009 e giugno 2011.

Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Torino (n. 0087999).

I pazienti selezionati hanno accettato la terapia proposta e firmato il consenso informato.

Criteri di inclusione

- Età maggiore di 21 anni.
- Pazienti affetti da parodontite cronica o aggressiva con presenza di difetti infraossei profondi prevalentemente a 1-2 pareti. I difetti non devono coinvolgere l'area della biforcazione.
- Pazienti con full-mouth plaque score (FMPS) <20% e full-mouth bleeding score (FMBS) <20% al termine della fase di terapia parodontale non chirurgica.
- Pazienti che necessitano dell'estrazione di uno o più elementi dentali vitali per motivi ortodontici o di disodontiasi. Il dente da estrarre non deve essere adiacente al sito da trattare, deve essere vitale e non deve presentare restauri né conservativi né protesici.
- Mediante la valutazione clinica e radiografica deve essere confermata la componente infraossea del difetto ≥ 3 mm. E' richiesta una ulteriore conferma in fase chirurgica.
- Strettamente correlata alla presenza di un difetto infraosseo ≥ 3 mm è la rilevazione di tasche ≥ 6 mm.
 1. I possibili siti sperimentali vengono selezionati al momento della rivalutazione parodontale individuando tasche con un sondaggio ≥ 6 mm.

2. I siti rilevati al punto 1. Vanno confermati dallo status radiografico iniziale.
3. Conferma di 1. e 2. con la rilevazione di radiografie endorali eseguite con centratore di RINN personalizzato.

Si riconoscano la giunzione amelo-cementizia (CEJ) e la cresta alveolare. Il pavimento del difetto osseo viene identificato, in accordo con i criteri di Bjorn, nell'area più coronale dove sia ancora possibile riconoscere l'architettura del legamento parodontale. Si rilevino le distanze a e b: a=distanza tra la CEJ e la base del difetto osseo, b= profondità radiografica della componente infraossea del difetto.

Se fosse presente una discrepanza evidente tra rilevazioni radiografiche e misurazione clinica si consideri la misura più piccola fra le due.

- Presenza di una sufficiente banda di gengiva cheratinizzata per l'ancoraggio delle suture previsto dal protocollo operativo.

Criteri di esclusione

1. Gravidanza ed allattamento.
2. Patologie sistemiche in grado di determinare alterazioni a livello parodontale (diabete, collagenopatie, malattie immunologiche, trapianti d'organo).
3. Fumatori di pipa, sigaro e sigaretta.
4. Assunzione di farmaci causa di ipertrofia gengivale (antiepilettici, Ca-antagonisti, ciclosporina A, estroprogestinici).
5. Trattamento ortodontico in atto.
6. Pazienti con età inferiore ai 21 anni e superiore ai 70 anni.
7. Denti con mobilità di grado III, coinvolgimento delle biforcazioni e frattura dentaria.

Pretrattamento

Tutti i pazienti prima di essere inclusi nello studio sono stati sottoposti a terapia parodontale non chirurgica che prevedeva sedute di motivazione all'igiene orale, detartrasi, levigatura radicolare e, quando necessario, la somministrazione di antibiotici sistemici.

Durante la prima seduta sono state fornite ai pazienti inclusi nello studio le informazioni riguardanti la diagnosi e le procedure terapeutiche. Sono stati poi effettuati la motivazione all'igiene orale domiciliare e l'insegnamento della tecnica di spazzolamento di Bass modificata e dell'uso degli ausili per l'igiene interprossimale mediante filo interdentale, evitando l'utilizzo di scovolini al fine di minimizzare la contrazione del tessuto.



Figura 1: Immagini pre (in alto) e post (in basso) terapia causale del paziente.

Particolare importanza è stata data a questa fase terapeutica per motivare il paziente al raggiungimento di un adeguato controllo di placca domiciliare (FMPS e FMBS <20%). Successivamente i pazienti sono stati sottoposti a sedute di detartrasi e levigatura radicolare a sestanti, attuate con strumentazione meccanica e piezoelettrica. La strumentazione è stata attuata in modo delicato, con la finalità di

non ledere i tessuti molli e di limitarne il più possibile la contrazione a livello dei siti da trattare.

Particolare attenzione è stata posta al controllo occlusale.

Misure di baseline

Non prima della settimana precedente l'intervento chirurgico e non dopo l'esecuzione dell'anestesia locale nel giorno del medesimo, devono essere registrati i seguenti parametri e rilevate le seguenti fotografie:

1. Fotografia endorale (aspetto vestibolare e linguale) nell'area con il difetto con e senza sonda inserita con ingrandimento 1:1.
2. Set completo fotografico della bocca (3 foto vestibolari, 6 linguali-palatali, 2 occlusali)
3. Indice di placca
4. Indice di sanguinamento
5. Sondaggio della tasca (profondità di sondaggio e livello di attacco clinico) nel sito selezionato
6. Recessione del margine gengivale libero nel sito selezionato.

Nel caso in cui il dente con il difetto presenti mobilità viene splintato in modo temporaneo ai denti adiacenti per mezzo di splints adesivi extracoronali.

Durante la fase iniziale del trattamento va verificata e, se necessario, corretta la presenza di trauma occlusale.



Figura 2: *Profondità di sondaggio (PPD) prima della chirurgia dell'elemento dentale 4.7 di 8 mm.*

Fase chirurgica

Il campo operatorio è stato allestito ricoprendo le superfici ed il paziente con teli sterili. La cute del distretto periorale del paziente è stata disinfettata con clorexidina al 4%.

È stato fatto eseguire al paziente uno sciacquo di 1 minuto con collutorio alla clorexidina 0.12% .

È stata effettuata anestesia plessica loco regionale con lidocaina al 2% con vasocostrittore in rapporto 1:50000.

Incisione e disegno del lembo

I difetti angolari sono stati trattati con lo scollamento di un lembo secondo la tecnica MPPT: Modified Papilla Preservation Technique proposta da Cortellini et al. nel 1995.⁽⁶⁶⁾

Preparazione del difetto e della superficie radicolare

Dopo lo scollamento del lembo tutto il tessuto di granulazione è stato completamente rimosso dall'interno del difetto fino ad esporre le fibre del legamento parodontale mediante l'utilizzo di curettes e strumenti ultrasonici. Una volta eliminato il tessuto di granulazione sono stati asportati i depositi mineralizzati presenti lungo la superficie radicolare.



Figura 3: *Immagine del difetto infraosseo prima dell'innesto del biomateriale.*

Misure intra-chirurgiche

Dopo la pulizia e il curettaggio del difetto intraosseo sono state rilevate le seguenti misurazioni:

- Distanza tra giunzione amelo-cementizia e il pavimento del difetto (CEJ-BD: cementum enamel junction – bone defect).
- Distanza tra giunzione amelo-cementizia e la porzione più coronale della cresta ossea interprossimale (CEJ-BC: cementum enamel junction – bone crest).

È stata ricavata la componente infraossea del difetto come differenza delle due precedenti misurazioni (BC-BD).

Prelievo Pulpare

Si è proceduto all'avulsione dell'elemento che necessitava di estrazione. L'elemento avulso è stato deterso usando CHX 0,2% per 60 sec, sezionato all'altezza del colletto mediante martello e scalpello chirurgico. Una volta sezionata la camera pulpale la polpa dentaria è stata prelevata mediante curette di Gracey sterile e posta all'interno di contenitori sterili monouso e frammentata meccanicamente utilizzando il disgregatore biologico Rigenera Machine. Successivamente è stata fatta passare la polpa attraverso filtri con pori di 50 micron⁽⁶⁷⁾ in 1 mL di soluzione fisiologica sterile, al fine di ottenere una sospensione cellulare ricca di progenitori delle cellule

staminali. La polpa frammentata unitamente alla soluzione fisiologica è stata posta su uno scaffold di collagene (Gingistat). Il complesso costituito dal biomateriale e dalla polpa costituisce il materiale da innesto che viene posizionato nel difetto.



Figura 4: innesto del biomateriale costituito dalle cellule staminali prelevate dalla polpa dentaria (DPSCs) e uno scaffold in collegare (Gingistat).

Tecnica di sutura

Sono stati utilizzati fili di sutura in Gore-Tex (CV7) 7-0. La chiusura primaria del lembo è stata ottenuta senza tensioni.

In alcuni casi è stato necessario mobilizzare ulteriormente il lembo vestibolare al fine di ottenere una adeguata esposizione del difetto con una incisione di scarico limitata alla banda di gengiva aderente.

Infine, i lembi sono stati stabilizzati con sutura a materasso interno orizzontale e a cerchio semplice sulla linea di incisione nella zona della papilla preservata ed eventuali suture a cerchio qualora fosse stato necessario effettuare incisioni di scarico.



Figura 5: Foto vestibolare a sutura eseguita.

Istruzioni post chirurgiche

Il dolore e l'edema post-chirurgici sono stati controllati con la somministrazione di Nimesulide 100 mg due volte al giorno per cinque giorni.

La prima settimana post-intervento ha anche previsto l'assunzione di un regime antibiotico: 875mg di amoxicillina + 125mg di ac. clavulanico somministrato alla fine della seduta chirurgica e ogni 12h per i 5 giorni successivi.

I pazienti sono stati istruiti ad apporre sulla cute prospiciente il sito chirurgico una borsa del ghiaccio per le prime 2h dopo la seduta chirurgica in modalità alternata con applicazione per 15' e sospensione per altri 15'. Nella prima settimana sono stati anche istruiti a non esercitare trazioni muscolari eccessive nell'area del sito chirurgico. Non essendo stato applicato un impacco parodontale è stata loro spiegata la necessità di modificare le normali procedure di igiene orale sospendendo lo spazzolamento e di evitare la masticazione nell'area interessata. Durante questo periodo, il controllo dell'accumulo della placca è stato effettuato mediante sciacqui di 1 min con collutorio contenente clorexidina allo 0.2% 3 volte al giorno per i primi 10 giorni, poi allo 0.12% 3 volte al giorno per 4 settimane. Lo spazzolamento è interrotto per i primi 15 giorni dopo l'intervento, l'utilizzo del filo interdentale per il primo mese.

Follow up ed igiene domiciliare

La rimozione della sutura è stata effettuata dopo 10 giorni. Sono stati programmati controlli alla II e IV settimana e, poi, al III, VI e XII mese. Durante i controlli l'obiettivo è stato monitorare la guarigione del sito chirurgico e rimuovere professionalmente la placca batterica. E' stata rilevata, in particolare, la presenza di eventuali deiscenze dei lembi e di ipersensibilità dentinale. Le complicanze postoperatorie e l'eventuale mancanza di collaborazione da parte del paziente sono state annotate sull'apposito modulo di valutazione.

L'area trattata è stata sottoposta ad igiene professionale ad ogni visita di controllo. Questa consisteva in una rimozione della placca sopragengivale per mezzo di coppetta di gomma su manipolo a bassa velocità o ablatore. Dopo aver rilevato il livello di igiene orale, quando necessario, sono state impartite al paziente ulteriori istruzioni.

Ad ogni appuntamento sono state ribadite le istruzioni per il post - operatorio:

- Utilizzo di clorexidina 0,2% per i 10 giorni successivi all'intervento, in seguito 0,12% per le 4 settimane successive alla chirurgia;
- Abolizione dello spazzolamento fino alla fine della seconda settimana e dell'utilizzo del filo nel sito trattato fino alla quarta settimana;
- Non traumatizzare né masticare nel sito trattato.

All'appuntamento della quarta settimana sono state effettuate delle rilevazioni fotografiche: una vestibolare e una linguale.

Dopo il I mese i pazienti hanno ripreso lo spazzolamento molto delicatamente e l'uso del filo e hanno interrotto l'uso della clorexidina. Sono stati inseriti in un protocollo di mantenimento fino al termine dello studio.

Terapia parodontale di mantenimento

Alla XI settimana i pazienti sono stati nuovamente istruiti sulle manovre di igiene orale, in particolare sull'uso del filo interdentale. Sono stati rimossi gli eventuali depositi di placca senza danneggiare la formazione di un nuovo attacco.

E' stato informato il paziente della possibilità di riprendere gradatamente la funzione masticatoria nel sito trattato.

I pazienti sono stati sottoposti ad igiene professionale full-mouth al III, VI, IX e XII mese. Si è fatta particolare attenzione a non strumentare l'area sottogengivale a livello dei siti trattati fino all'anno post-intervento.

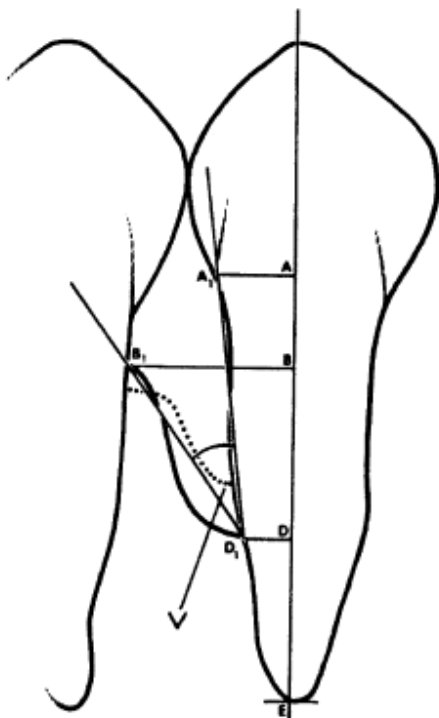
Sono state rilevate fotografie vestibolari e linguali al XII mese prima di effettuare la seduta di igiene (rapporto di ingrandimento 1:1).

Valutazione a 6 e 12 mesi

Sono stati rilevati i seguenti parametri:

- 1) Fotografia intraorale dell'area trattata con sonda inserita nel difetto con un ingrandimento 1:1.
- 2) Indice di placca.
- 3) Indice gengivale.
- 4) Profondità di sondaggio nel sito sperimentale.
- 5) Recessione del margine gengivale nel sito sperimentale.
- 6) Recessione del margine gengivale del dente selezionato.
- 7) Recessione del margine gengivale del dente adiacente al dente con il difetto.
- 8) Radiografie periapicali dell'area trattata con la tecnica del cono lungo.
- 9) Le rilevazioni sono state confrontate con quelle acquisite al baseline.

Le radiografie periapicali sono state eseguite con centratore di Rinn personalizzato. E' stato calcolato l'angolo radiografico e la componente radiografica intraossea dei difetti trattati utilizzando uno scanner ad alta definizione con retroilluminazione (Epson Scan) ed identificando sulle suddette immagini reperti anatomici in base ai criteri di Bjorn et al. (1969)⁽⁶⁸⁾ e Schei et al. (1959):⁽⁶⁹⁾



A1: La giunzione amelo-cementizia (CEJ) del dente coinvolto nel difetto infraosseo;

B2: La posizione più coronale della cresta ossea alveolare del difetto infraosseo nel punto in cui questa tocca la superficie della radice del dente adiacente prima del trattamento (il punto più coronale della cresta);

D1: L'estensione più apicale del difetto dove lo spazio del legamento parodontale mantiene il suo normale spessore prima del trattamento (il fondo del difetto).

L'angolo radiografico del difetto è definito da due linee che rappresentano la superficie della radice del dente coinvolto e la superficie ossea del difetto, come descritto da Steffenson & Weber (1989)⁽⁷⁰⁾ e Tonetti (1993)⁽⁷¹⁻⁷²⁾. Queste linee sono state espresse come A1D1 e B1D1, rispettivamente.

Il valore INTRA rx è misurato come distanza tra la proiezione di B1 sul segmento A1B1 e il fondo del difetto D1.

Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Torino.

RISULTATI

Il campione oggetto dello studio comprendeva 8 soggetti trattati in modo consecutivo mediante terapia non chirurgica, selezionati nel periodo tra febbraio 2009 e giugno 2011. L'età media dei pazienti era di 55 anni (range 40-70 anni).

Degli 8 pazienti selezionati, tutti presentavano al termine della terapia non chirurgica un FMPS (Full mouth plaque score) $\leq 15\%$, nessuno di loro fumava e tutti erano in condizioni di salute sistemica.

Per ogni paziente è stato selezionato un difetto intraosseo da sottoporre all'innesto di tessuto connettivo autologo di derivazione pulpare. Il numero totale degli interventi chirurgici è stato 8.

I difetti erano localizzati: 2 a livello degli incisivi, 3 dei canini, 1 del secondo premolare e 2 a livello dei molari.

Non si sono verificate complicanze post-chirurgiche. Tutti i pazienti hanno completato il follow-up a 12 mesi.

Il valore medio di FMPS era pari a $6,65 \pm 3,04\%$, prima della chirurgia, a $10 \pm 5,43\%$ a sei mesi e a $11,78 \pm 6,64\%$ alla rivalutazione a un anno mentre l'indice di sanguinamento (FMBS) calcolato prima degli interventi era di $11,33 \pm 5,18\%$, $5,83 \pm 2,71\%$ a sei mesi ed alla rivalutazione ad un anno risultava essere di $6,33 \pm 3,36\%$.

Non si è rilevata presenza di sanguinamento al sondaggio nel sito sperimentale a 6 e a 12 mesi dalla chirurgia.

La profondità di sondaggio (PPD) media prima della chirurgia era di $8,25 \pm 1,28$ mm e tale media risultava diminuita a $3,50 \pm 0,93$ mm a sei mesi e a $3,38 \pm 0,74$ mm a 12 mesi. Il guadagno di PPD è risultato essere pari a $4,75 \pm 1,04$ mm a sei mesi e $4,88 \pm 1,46$ mm ad un anno dall'intervento.

La media delle recessioni era al baseline di $2,00 \pm 1,07$ mm, di $2,43 \pm 0,74$ mm a sei mesi e $2,13 \pm 0,83$ mm a un anno con un peggioramento della recessione rispetto al baseline di $0,13 \pm 0,64$ mm a 12 mesi.

Il CAL è diminuito in media da $10,38 \pm 2,33$ mm prima dell'intervento a $5,88 \pm 0,99$ mm a sei mesi ed a $5,63 \pm 1,19$ mm alla rivalutazione a 12 mesi, con un guadagno del livello di attacco clinico a un anno di $4,00 \pm 1,93$ a sei mesi e $4,75 \pm 1,75$ mm a un anno dall'intervento.

Tabella 1

	BASELINE					6 MESI					12 MESI				
	PPD	REC	CAL	INTRA rx	RA	PPD	PPD reduction	REC	CAL gain	INTRA rx	PPD	PPD reduction	REC	CAL gain	INTRA rx
1	7	2	9	6,03	27	3	4	3	3	4,95	4	3	2	3	4,57
2	8	0	8	8,76	26	4	4	2	2	5,8	3	5	1	4	4,2
3	7	1	8	3,08	30	4	3	1	3	1,8	4	3	1	3	1,35
4	9	3	12	6,10	24	4	5	3	5	2,13	3	6	3	6	1,42
5	8	3	11	6,50	34	3	5	3	5	2,4	4	4	3	4	1,26
6	8	2	10	3,50	21	2	6	2	6	1,92	2	6	2	6	1,7
7	8	2	10	5,40	20	3	5	3	4	4,8	3	5	3	4	2,4
8	11	3	15	8,80	16	5	6	2	8	2,57	4	7	2	8	2,41
MEDIA	8,25	2,00	10,38	6,02	26,00	3,50	4,75	2,43	4,00	3,30	3,38	4,88	2,13	4,75	2,41
DEV. ST.	1,28	1,07	2,33	2,10	5,78	0,93	1,04	0,74	1,93	1,61	0,74	1,46	0,83	1,75	1,30

Tabella 1: PPD : profondità di sondaggio, REC : recessione, CAL : livello di attacco clinico, INTRA rx : componente radiografica infraossea,, PPD reduction: riduzione della profondità di sondaggio, CAL gain : guadagno del livello di attacco, RA : angolo radiografico

Per quanto riguarda l'analisi della componente intraossea del difetto durante l'intervento chirurgico è stato registrato il livello di sondaggio osseo (CEJ-BD) che era compreso tra 8 e 15 mm (media: $9,71 \pm 2,13$ mm).

L'INTRA rx risultava di $6,02 \pm 2,10$ mm al baseline e diminuiva a $3,30 \pm 1,61$ mm a sei mesi e a $2,41 \pm 1,30$ mm a un anno.

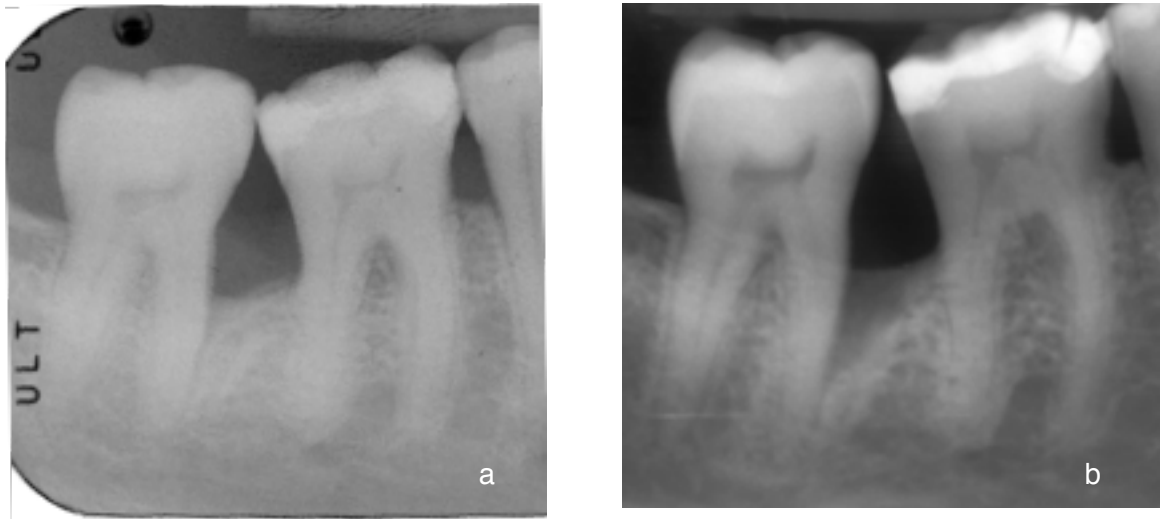


Figura 6 a,b: radiografia eseguita con centratore personalizzato prima della chirurgia (a) e dopo 12 mesi (b). Notare la completa risoluzione radiografica del difetto.

DISCUSSIONE

L'obiettivo dello studio è valutare l'efficacia in rigenerazione parodontale di cellule staminali prelevate dalla polpa dentaria (DPSCs) veicolate da uno scaffold di collagene di origine equina nel trattamento dei difetti infraossei.

Un approccio ricostruttivo, basato sull'uso delle cellule staminali della polpa nel trattamento di difetti intraossei, era già stato descritto in uno studio clinico del 2009⁽⁶⁵⁾ che ha dimostrato come le cellule staminali del tessuto pulpale abbiano una significativa capacità nel rigenerare tessuto osseo. Evidenza istologica di una rigenerazione dei tessuti del parodonto profondo è stata recentemente riportata da uno studio su modello animale⁽⁸¹⁾.

Il razionale alla base del presente studio è che tutti i tessuti parodontali derivano dagli stessi progenitori cellulari originati dalla cresta neurale, da cui derivano le cellule ecto-mesenchimali. Tali cellule migrando nella regione cranio-facciale dell'embrione danno origine alla papilla dentale e ai tessuti circostanti. Una piccola percentuale di esse rimane all'interno dei tessuti ed un'area, dove è possibile isolare queste cellule staminali dopo la nascita, è la polpa dentale.⁽⁷³⁾

Nel nostro studio sono stati trattati otto difetti intraossei, prevalentemente a 1 o 2 pareti, e sono stati valutati i risultati clinici e radiografici a distanza di 6 e 12 mesi dalla chirurgia mediante lembo con preservazione della papilla ed innesto di spugna di collagene e cellule staminali prelevate dalla polpa dentale, in accordo con precedenti studi sperimentali in vitro e in vivo su modello animale.^{(56) (61) (74) (62)}

L'efficacia del protocollo da noi seguito per ottenere una sospensione di DPSCs è stata recentemente dimostrata.⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁷⁾ Dopo la dissociazione meccanica della polpa e la selezione delle cellule attraverso un filtro sulla base delle loro dimensioni, considerando che le cellule progenitrici hanno dimensioni inferiori mediamente a 50 micron, si ottiene una sospensione cellulare che contiene una percentuale pari al 77% di cellule che esprimono il marker di staminalità CD34.⁽⁶⁵⁾

Da questo lavoro emerge che si ottiene un miglioramento di PD e CAL in tutti i difetti trattati. Dall'analisi delle radiografie endorali si evidenzia la non completa

risoluzione del difetto intraosseo nella sua parte più coronale. Possiamo però osservare che i difetti a 12 mesi risultano avere una componente intraossea residua media inferiore ai 2,41 mm. E' importante evidenziare anche che tutti i pazienti arruolati nello studio presentavano al termine della terapia non chirurgica valori di FMPS \leq 15% che, pur essendo aumentati nelle rivalutazioni successive alla chirurgia, sono rimasti inferiori al 20% durante l'intero periodo sperimentale.

I risultati clinici ottenuti, se paragonati a tecniche chirurgiche conservative, appaiono migliori. Se si prende come riferimento la review di Graziani et al. del 2012⁽⁷⁵⁾ risulta che in media il guadagno di livello di attacco clinico per le tecniche chirurgiche conservative (Open Flap, Lembo di Widman modificato e lembi di preservazione della papilla) è di 1,65 mm (95% CI: 1,36 - 1,94; $p < 0,0001$) mentre la riduzione della profondità di sondaggio 2,85 mm (95% CI: 2,47-3,22; $p < 0,0001$). Da un'analisi per sottogruppo delle tecniche chirurgiche emerge che con l'Open Flap e il lembo di Widman modificato si ottengono un guadagno di attacco di 1,57 mm (95% CI: 1,25-1,89; $p < 0,0001$) e una riduzione della profondità di sondaggio di 2,77 mm (95% CI: 2,33-3,21; $p < 0,0001$) con un aumento della recessione di 1,35 mm (95% CI: 1,01-1,29; $p < 0,0001$), mentre con le tecniche chirurgiche con preservazione della papilla (MPPT, SPPT) il guadagno di CAL risulta essere pari a 2,48 mm (95% CI: 1,44-3,52; $p < 0,0001$), la riduzione di PPD di 3,59 mm (95% CI: 2,33-4,85; $p < 0,0001$) e le recessioni aumentavano di 1,31 mm (95% CI: 0,20-2,43; $p < 0,0001$).

Con la tecnica M-MIST, proposta da Cortellini & Tonetti nel 2011,⁽⁷⁶⁾ il guadagno di CAL risulta pari a $4,1 \pm 1,4$ mm e la riduzione di PPD a $4,4 \pm 1,6$ mm con una riduzione delle recessione in media di $0,3 \pm 0,6$ mm .

Nel nostro studio il guadagno di livello di attacco a 12 mesi e la riduzione della profondità di sondaggio risultano rispettivamente di $4,75 \pm 1,75$ mm e $4,88 \pm 1,46$ mm. Da questi dati si potrebbe ipotizzare che l'utilizzo di cellule staminali possa dare un vantaggio aggiuntivo rispetto al solo coagulo.

Prendendo come riferimento il lavoro di Tonetti et al. del 2002⁽⁷⁷⁾, che prende in esame il trattamento dei difetti intraossei con EMD e tecnica di preservazione della

papilla, si rileva che il guadagno medio di livello di attacco clinico a 12 mesi è $3,1 \pm 1,5$ mm e la riduzione della profondità di sondaggio $3,9 \pm 1,7$ mm.

Per quanto riguarda, invece, il trattamento dei difetti intraossei con GTR mediante lembo a preservazione della papilla, alcuni lavori^(78,79) riportano un guadagno di livello di attacco a 12 mesi tra 3,5 e 4,2 mm, mentre la riduzione di profondità di sondaggio è compresa tra 4,4 e 6,5 mm. Si nota, pertanto, come i nostri risultati siano in linea con quelli ottenuti con l'EMD ed la tecnica GTR. Da evidenziare è che in questo lavoro non è stato utilizzato un materiale di riempimento per prevenire il collasso dei tessuti molli e aumentare la stabilità del coagulo. Questo anche per evitare che la sua radiopacità potesse influenzare la valutazione del grado di riempimento radiografico del difetto.

Inoltre, occorre sottolineare che in questo studio non è stata usata una tecnica che prevedesse un approccio chirurgico minimamente invasivo come la MIST, M-MIST e SFA che garantiscono una maggiore stabilità del coagulo.

Potrebbe essere interessante associare le potenzialità delle cellule staminali ad una tecnica chirurgica minimamente invasiva che, riducendo lo scollamento dei lembi, aumenti la stabilità del coagulo.

CONCLUSIONI

Questo studio pilota sembra confermare l'efficacia del complesso biologico costituito da DPSCs e spugna di collagene nel trattamento di difetti infraossei non contenitivi. Clinicamente e radiograficamente si ottiene un miglioramento di PD e CAL ed un riempimento dei difetti in tutti i siti trattati con cellule staminali veicolate mediante uno scaffold di collagene, tuttavia, data l'assenza di dati istologici, non possiamo dichiarare quale sia il tipo di tessuto ottenuto con questa tecnica. ⁽⁸⁰⁾

Limite del presente studio è il numero limitato di casi che è stato definito su indicazione del Comitato Etico, essendo uno studio pilota.

Alla luce dei risultati ottenuti potrebbe essere interessante eseguire un studio clinico randomizzato e controllato su una casistica più ampia per comparare le potenzialità della tecnica sopra descritta con le convenzionali tecniche rigenerative.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Atti dei Congressi XVI Congresso Internazionale Società Italiana di Parodontologia 15 16 Marzo 2013 Romano F., Perotto S., Castiglione A., Cricenti L., Mariani G., Ferrarotti F., Aimetti M. Prevalence and risk indicators of periodontitis: a population-based cross sectional epidemiological survey.
- 2- Papapanou PN, Tonetti MS. *Periodontol* 2000. 2000 Feb;22:8-21. Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions.
- 3-Jan Lindhe, Niklaus P. Lang, Thorkild Karring. *Parodontologia clinica e implantologia orale*
- 4- Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. Needleman IG, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker RJ. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Apr 19; (2):CD001724.
- 5- *Ann Periodontol*. 2003 Dec;8(1):266-302. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. Murphy KG, Gunsolley JC.
- 6-Arweiler NB, Auschill TM, Donos N, Sculean A. Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality. *Clin Oral Investig*. 2002 Dec;6(4):205-9. Epub 2002 Nov 14.
- 7-Sculean A, Auschill TM, Donos N, Brex M, Arweiler NB. Effect of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) on ex vivo dental plaque vitality. *J Clin Periodontol*. 2001 Nov;28(11):1074-8.
- 8-Spahr A, Lyngstadaas SP, Boeckh C, Andersson C, Podbielski A, Haller B. Effect of the enamel matrix derivative Emdogain on the growth of periodontal pathogens in vitro. *J Clin Periodontol*. 2002 Jan;29(1):62-72.
- 9-Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P, Worthington HV. *Eur J Oral Implantol*. 2009 Winter;2(4):247-66. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. A Cochrane systematic review.
- 10- Trombelli L, Bottega S, Zucchelli G. Supracrestal soft tissue preservation with enamel matrix proteins in treatment of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol*. 2002 May;29(5):433-9.
- 11-Tu Y-K, Woolston A, Faggion CM Jr. Do bone grafts or barrier membranes provide additional treatment effects for infrabony lesions treated with enamel matrix derivatives? A network meta-analysis of randomized-controlled trials. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 59–79. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01499.x.
- 12-Sipos PM, Loos BG, Abbas F, Timmerman MF, van der Velden U. The combined use of enamel matrix proteins and a tetracycline-coated expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane in the treatment of intra-osseous defects. *J Clin Periodontol*. 2005 Jul;32(7):765-72.
- 13-Zucchelli G, Amore C, Montebugnoli L, De Sanctis M. Enamel matrix proteins and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a comparative controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2003 Dec;74(12):1725-35.

- 14-Trombelli L, Farina R. Clinical outcomes with bioactive agents alone or in combination with grafting or guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl): 117-35. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01265.x
- 15- H. Burchardt, The biology of bone graft repair. *Clinical orthopaedics and related research*. Vol 174 pp28-42,1983.
- 16-Piattelli A, Degidi M, Di Stefano DA, Rubini C, Fioroni M, Strocchi R. Microvessel density in alveolar ridge regeneration with autologous and alloplastic bone. *Implant Dent*. 2002;11(4):370-5.
- 17-Jensen T, Schou S, Svendsen PA, et al. Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios: a radiographic study in minipigs. *Clinical Oral Implants Research*. 2011
- 18-Gielkens PFM, Schortinghuis J, de Jong JR, et al. The influence of barrier membranes on autologous bone grafts. *Journal of Dental Research*. 2008;87(11):1048–1052.
- 19-Gielkens PFM, Bos RM, Raghoobar GM, Stegenga B. Is there evidence that barrier membranes prevent bone resorption in autologous bone grafts during the healing period? A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2007;22(3): 390–398.
- 20-Galindo-Moreno P, Hernández-Cortés P, Mesa F, et al. Slow resorption of anorganic bovine bone by osteoclasts in maxillary sinus augmentation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2012
- 21-Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clinical Oral Implants Research*. 2003;14(2):137–143.
- 22-Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clinical Oral Implants Research*. 2010;21(9):961–970.
- 23-Amerio P, Vianale G, Reale M, Muraro R, Tulli A, Piattelli A. The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. *Clinical Oral Implants Research*. 2010;21(6):650–655.
- 24-Rasperini G, Canullo L, Dellavia C, Pellegrini G, Simion M. Socket grafting in the posterior maxilla reduces the need for sinus augmentation. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2010;30(3):265–273.
- 25-Araújo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research*. 2009;20(1):1–6.
- 26-Verdugo F, D'Addona A. Long-term stable periodontal regeneration by means of autologous bone grafting in patients with severe periodontitis. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2012;32(2):157–164.
- 27-H. H. Takei, T. J. Han, F. A. Carranza Jr., E. B. Kenney, and V. Lekovic, “Flap technique for periodontal bone implants. Papilla preservation technique,” *Journal of Periodontology*, vol. 56, no.4, pp. 204–210, 1985.

- 28-Cortellini P, Tonetti MS. Minimally invasive surgical technique and enamel matrix derivative in intra-bony defects. I: Clinical outcomes and morbidity. *J Clin Periodontol*. 2007 Dec;34(12):1082-8. Epub 2007 Oct 22.
- 29-Cortellini P, Tonetti MS. Improved wound stability with a modified minimally invasive surgical technique in the regenerative treatment of isolated interdental intrabony defects. *J Clin Periodontol*. 2009 Feb;36(2):157-63. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01352.x
- 30-Trombelli L, Farina R, Franceschetti G, Calura G. Single-flap approach with buccal access in periodontal reconstructive procedures. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):353-60. doi: 10.1902/jop.2009.080420 .
- 31-P. Cortellini and M. S. Tonetti, "Microsurgical approach to periodontal regeneration. Initial evaluation in a case cohort," *Journal of Periodontology*, vol. 72, no. 4, pp. 559–569, 2001
- 32-L. Trombelli, A. Simonelli, M. Pramstraller, U.M. E. Wikesjö, and R. Farina, "Single flap approach with and without guided tissue regeneration and a hydroxyapatite biomaterial in the management of intraosseous periodontal defects," *Journal of Periodontology*, vol. 81, no. 9, pp. 1256–1263, 2010.
- 33-P. Cortellini and M. S. Tonetti, "Clinical and radiographic outcomes of the modified minimally invasive surgical technique with and without regenerative materials: a randomized controlled trial in intra-bony defects," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 38, no. 4, pp. 365–373, 2011.
- 34-A. Mishra, H. Avula, K. R. Pathakota, and J. Avula, "Efficacy of modified minimally invasive surgical technique in the treatment of human intrabony defects with or without use of RhPDGF-BB gel—a randomized controlled trial," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 40, no. 2, pp. 172–179, 2013.
- 35-S. E. Lynch, *Tissue Engineering: Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics*, Quintessence Publishing, 2nd edition, 2008.
- 36- Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) promotes periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol* 1998; 69: 129–137.
- 37- Ishikawa I, Kinashita A, Oda S. Regenerative therapy in periodontal disease. Histological observation after implantation of rhBMP-2 in surgically created periodontal defects in dogs. *Dent Jpn* 1994; 31: 141–148.
- 38- King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res* 1997; 76: 1460–1470.
- 39- Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjö UM. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol* 1995; 66: 131–138.
- 40- Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA. Mandibular reconstruction with a recombinant bone inducing factor. Functional, histologic and biochemical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 1101–1112.

- 41- Xiang W, Baolin L, Yan J. The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; 51: 647–651.
- 42- D. L. Cochran, A. A. Jones, L. C. Lilly, J. P. Fiorellini, and H. Howell, “Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans,” *Journal of Periodontology*, vol. 71, no. 8, pp. 1241–1257, 2000.
- 43- T.H.Howell, J.Fiorellini, A. Jones et al., “A feasibility study evaluating rhBMP-2/ absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation,” *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, vol. 17, no. 2, pp. 125–139, 1997.
- 44- Wikesjö UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 2003 Aug;30(8):705-14.
- 45- Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhanced periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 545–548.
- 46- Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991; 62: 458–467.
- 47- Nevins M, Hanratty J, Lynch SE. Clinical results using recombinant human platelet-derived growth factor and mineralized freeze-dried bone allograft in periodontal defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007 Oct;27(5):421-7.
- 48- N-H Lin, S Gronthos, P M Bartold. Stem cells and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal* 2008;53:108-121
- 49- Kim Hynes, Danjela Menicanin, Stan Gronthos & P. Mark Bartold, Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration *Periodontology* 2000, Vol. 59, 2012, 203–227 Printed in Singapore. All rights reserved
- 50- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452–454.
- 51- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149–155.
- 52- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13625–13630.
- 53- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5807–5812.

- 54- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE* 2006; 1: e79.
- 55- Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005; 24: 155–165.
- 56- Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1394–1402.
- 57- Arthur A, Shi S, Zannettino AC, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells* 2009; 27: 2229–2237.
- 58- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531–535.
- 59- Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, Jansen JA. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 117–125.
- 60- Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, Gombos F, Caruso F, Guida L, Rullo R, Menditti D, Papaccio G. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*. 2006 May;17(3):511-5.
- 61- Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Naro F, Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2006 Mar;206(3):693-701.
- 62- Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, Laino G, Piattelli A, Pacifici M, De Rosa A, Papaccio G. Concave pit-containing scaffold surfaces improve stem cell-derived osteoblast performance and lead to significant bone tissue formation. *PLoS One*. 2007 Jun 6;2(6):e496.
- 63- Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplant* 2011; 20: 1003–1013.
- 64- Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 1823–1833.
- 65- d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater* 2009; 18: 75–83.
- 66- Cortellini P., Prato GP., Tonetti MS. (1995). A new surgical approach for interproximal regenerative procedures. *J. Periodontology*; 66(4): 261-6.
- 67- Graziano A, D'Aquino R, Brunelli G, Fanali S, Carinci F. Sinus lift augmentation using pulp stem cells: a case report and histological evaluation. *Eur J Inflammation* 2011;1 (Suppl):89-94.

- 68-Bjorn, H., Halling, A. & Thyberg, H. (1969). Radiographic assessment of marginal bone loss. *Odontologisk Revy* 20, 165–179.
- 69- Schei, O., Waerhaug, J., Lovdal, A. & Arno, A. (1959) Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *Journal of Periodontology* 30, 7–16.
- 70-Steffensen, B. & Weber, H.-P. (1989) Relationship between the radiographic periodontal defect angle and healing after treatment. *Journal of Periodontology* 60, 248–253.
- 71-Tonetti, M., Pini-Prato, G. & Cortellini, P. (1993b) Periodontal regeneration of human intrabony defects. IV. Determinants of healing response. *Journal of Periodontology* 64, 934–940.
- 72-Tonetti, M., Pini-Prato, G., Williams, R. & Cortellini, P. (1993a) Periodontal regeneration of human intrabony defects. III. Diagnostic strategies to detect bone gain. *Journal of Periodontology* 64, 269–277.
- 73- Balic A, Aguila HL., Caimano MJ., Francone VP, Mina M. (2010). Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars; *Bone*; 46:1639-1651.
- 74-D'Aquino R., Graziano A., Sampaolesi M., LAINO G., Pirozzi G., De Rosa A., Papaccio G. (2007). Human postnatal dental pulp cell co-differentiate into osteoblasts and endotheliocyte: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*; 14:1162-1171.
- 75- Graziani F, Gennai S, Cei S, Cairo F, Baggiani A, Miccoli M, Gabriele M, Tonetti M. Clinical performance of access flap surgery in the treatment of the intrabony defect. A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 145–156. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01815.x.
- 76-P. Cortellini and M. S. Tonetti, “Clinical and radiographic outcomes of the modified minimally invasive surgical technique with and without regenerative materials: a randomized controlled trial in intra-bony defects,” *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 38, no. 4, pp. 365–373, 2011.
- 77- Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P, Dubravec D, Fonzar A, Fourmoussis I, Mayfield L, Rossi R, Silvestri M, Tiedemann C, Topoll H, Vangsted T, Wallkamm B: Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. A multicentre randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 317–325. C Blackwell Munksgaard, 2002.
- 78- Cortellini P, Tonetti MS., Lang NP, Suvan JE, Zucchelli G, Vangsted T, Silvestri M, Rossi R, Mc Clain P, Fonzar A, Dubravec D, Adriaens P. (2001). The simplified papilla preservation flap in the regenerative treatment of deep intrabony defects: clinical outcomes and post-operative morbidity. *J. Clin periodontol*; 72:1702-1712.
- 79- Zucchelli G., Bernardi F., Montebugnoli L., e De Sanctis M., (2002). Enamel Matrix proteins and Guided Tissue Regeneration with Titanium-reinforced expanded Polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of intrabony defects: a comparative controlled Clinical Trial.. *J. Clin periodontol*; 73:3-12.
- 80-Caton J, Zander HA. Osseous repair of an intrabony pocket without new attachment of connective tissue. *J Clin Periodontol* 1976;3:54-58.

81-Mohamadreza BE, Khorsand A, Arabsolghar M, et al. Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. J Oral Implantol. 2012; Aug 1.