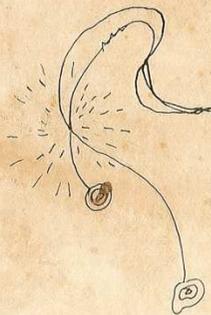
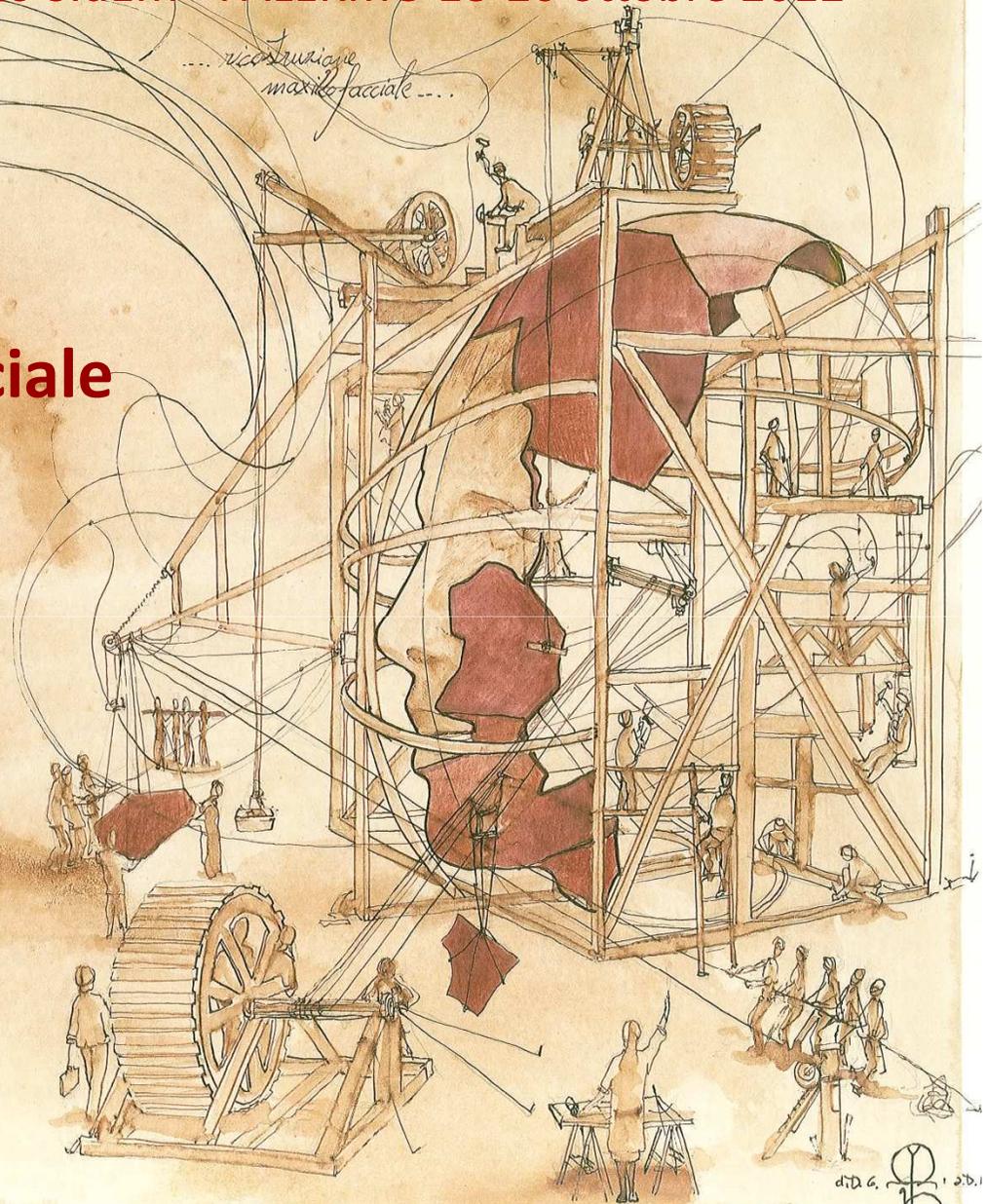


17° Corso Nazionale di Aggiornamento SIdEM - PALERMO 18-20 ottobre 2012

Rigenerazione ossea in chirurgia orale e maxillo facciale



*(dimostrare)
... le proprietà osteogenetiche
dei fattori di crescita
di derivazione plasmatica...*



Dr. Cristina Rinaldi

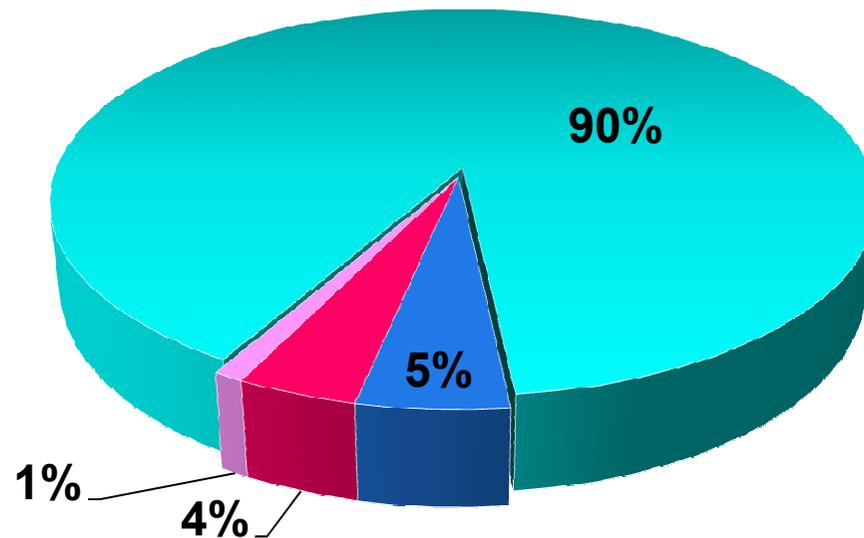
S.O.C. di Medicina Trasfusionale Az. Ospedaliera Universitaria di Udine

di D. G. ...
Darius Barby

100/100

ATROFIE/DIFETTI OSSEI dei MASCELLARI: CAUSE

- Edentulia e Malattia Parodontale
- Demolizione chirurgica per neoplasia
- Trauma
- Malformazioni



■ Edentulia e Mal. parodontale
■ Trauma

■ Demolizione per neoplasia
■ Malformazioni

Strategie rigenerative

“Tradizionale ”: innesto di osso autologo o sostituti

LIMITI all’IMPIEGO di OSSO AUTOLOGO:

Difficoltà di approvvigionamento (disponibilità limitata)

Morbilità del sito donatore (emorragie, infezioni, dolore cronico, fratture)

“Sperimentali”:

1. Stem Cell Therapy
2. Protein Therapy (rhGFs)
3. Gene Therapy

PRP in chirurgia orale e maxillo facciale

La storia

Whitman DH et al, 1997 Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 55(11), 1294

Marx DE et al, 1998 Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,85(6):638

Fine anni '90 ≅ 2005 : fase di “entusiasmo” (proliferare di device dell'industria e sistemi “home made”; spinta commerciale + interesse di trasfusionisti ed utilizzatori); numerosi case report, case series, pochi studi controllati

Dal 2005 : fase di “disillusione”: revisione critica degli studi pubblicati, risultati difficilmente interpretabili, spesso contrastanti

PRP in chirurgia orale e maxillo facciale

Il Presente e il Futuro

”Ridimensionamento” delle indicazioni all’uso del PRP, limitate a poche patologie, supportate dalle evidenze scientifiche

Emocomponenti di “seconda generazione”: Platelet Rich Fibrin (PRF)

Impiego del PRP (da sangue periferico, da sangue midollare o cordonale) /Lisato Piastrinico (PL) nel campo della **medicina rigenerativa ed ingegneria tissutale**

Applicazioni del PRP in chirurgia orale e maxillo facciale

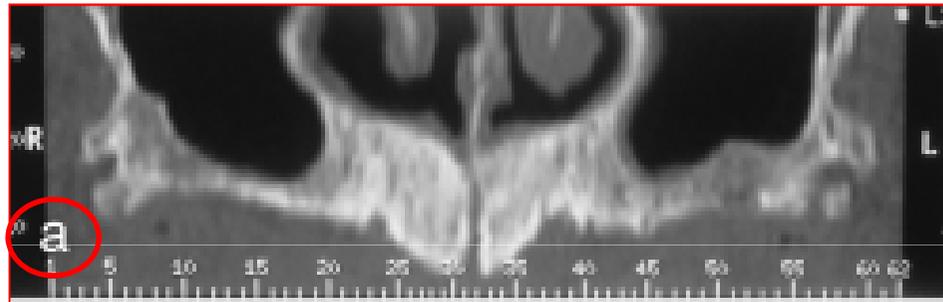
- Chirurgia pre implantare** (rialzo del seno mascellare/osteodistrazione verticale/innesto onlay)
- Ricostruzioni mascellari post resezioni/osteonecrosi**
- Difetti ossei periodontali**
- Osteointegrazione impianti
- Difetti perimplantari (difetti ossei perimplantari/perimplantite/siti post estrattivi)
- Fistole oro-nasali
- Cisti mascellari
- Riparazione di schisi del mascellare.

In campo odontoiatrico il PRP è stato inoltre utilizzato per ottenere una più rapida **guarigione dei tessuti gengivali e della mucosa orale**; del tutto recentemente, è stato proposto nella **GVHD del cavo orale** (Del Fante C et al, 2011).

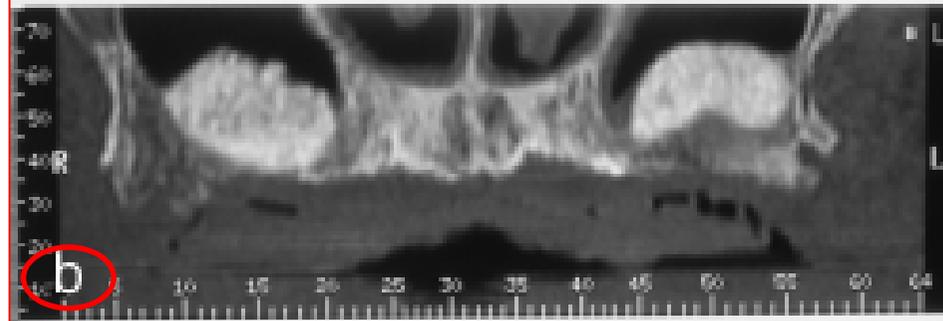
PRP e Sinus Lift : “a golden application”

Procedura chirurgica preimplantare necessaria ad aumentare l'altezza ed il volume osseo del mascellare severamente atrofico nei settori latero-posteriori

a) T.C. pre sinus lift



b) T.C. post innesto
PRP + osso autologo



Modello in vivo per testare l'efficacia del PRP ai fini della rigenerazione ossea (es. istologico su campione ottenuto al posizionamento degli impianti).

Vantaggi Potenziali del PRP nel “Sinus Lift”

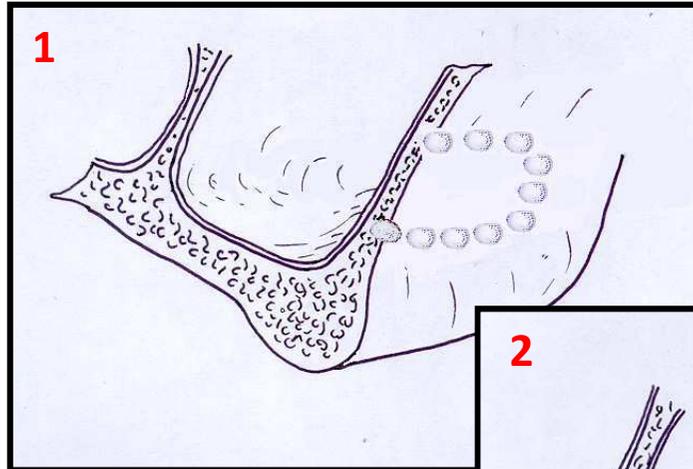
Boyapati L , WangHL (2006) Impl Dent 15(2): 160-9

- ❑ Più agevole manipolazione e posizionamento dell’innesto osseo;
- ❑ **Accelerata vascolarizzazione del graft;**
- ❑ Più rapida guarigione dei tessuti molli con ridotta morbilità post procedura chirurgica (riduzione di edema, dolore, sanguinamento);
- ❑ **Accelerata ed aumentata rigenerazione ossea;**
- ❑ **Riduzione dei tempi di riabilitazione implantare e protesica.**

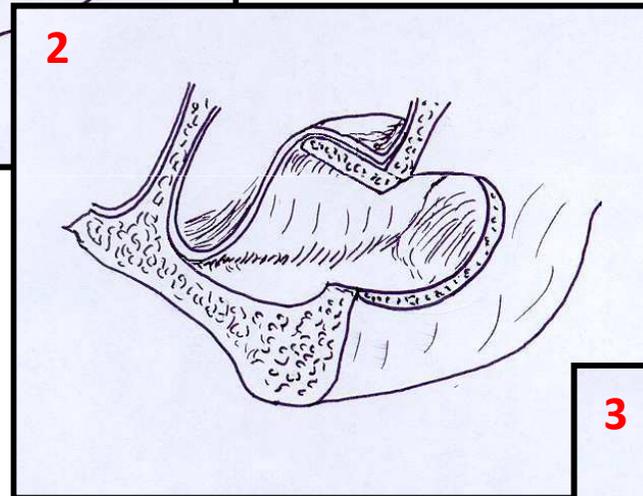
Bone Biological Box (BBB): an evolution of the sinus graft

Politi M et al, J Oral Maxillofac Surg 2003 61:1108-12

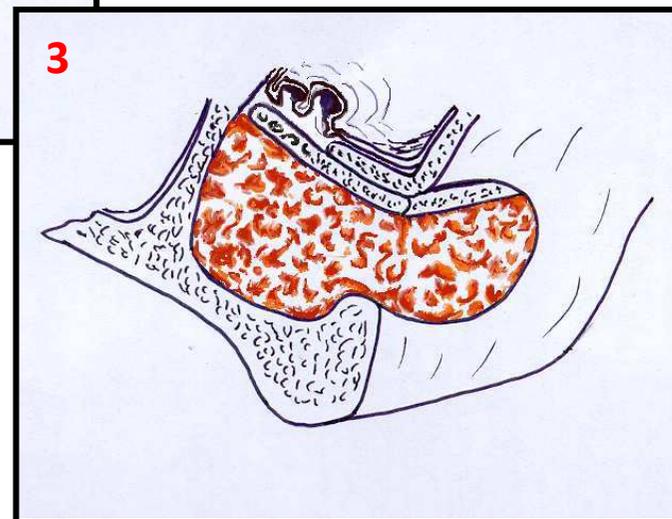
Tecnica chirurgica del Sinus Lift



1. Allestimento della botola antrale

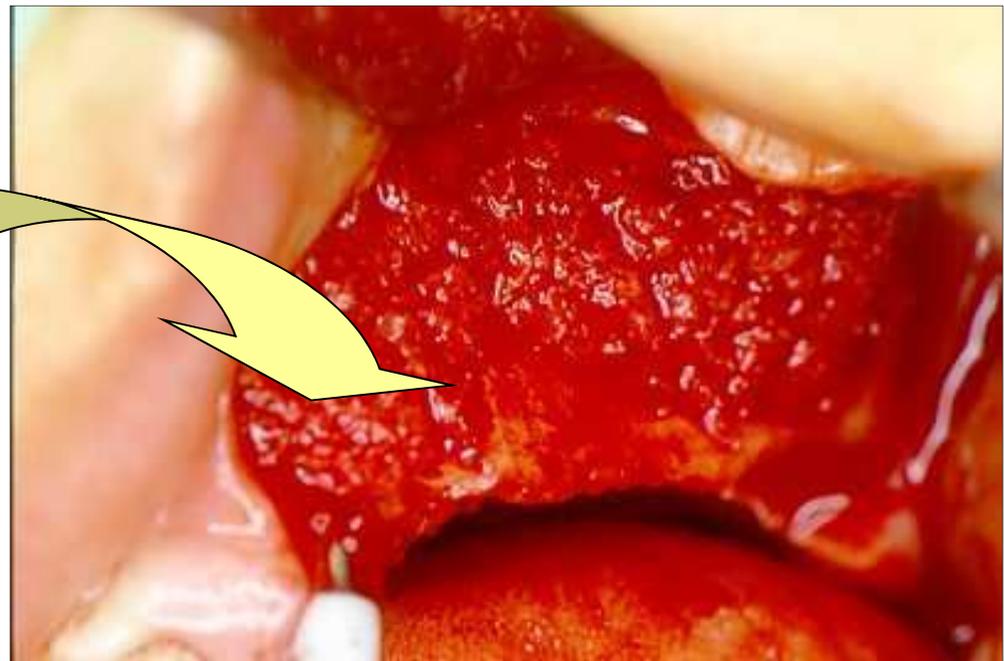
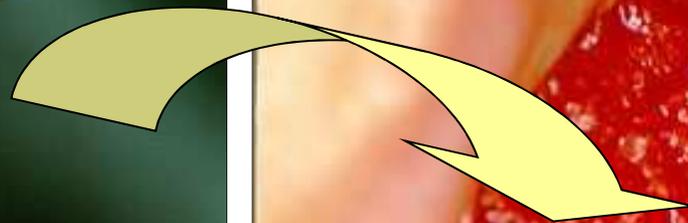
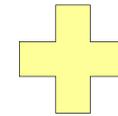
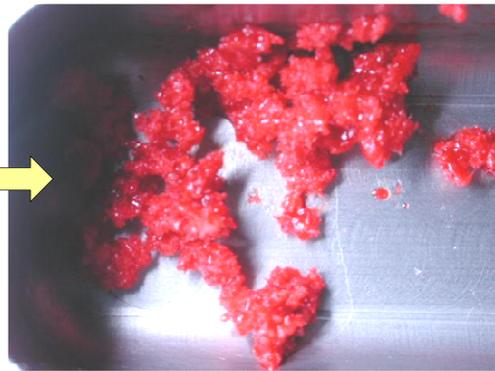


2. Elevazione della membrana:
preparazione del box chirurgico



3. Innesto di osso autologo +PRP

Innesto del PRP + frammenti osso autologo ("gel osteopiastroinico")



Valutazione istologica

7 CASI

Gel osteopiasstrinico autologo

5 CONTROLLI

Innesto osso autologo

Prelievi bioptici per analisi istologica ed istomorfometrica:

T1 a 3 mesi dall' innesto

T2 a 5 mesi +/- 15gg dall' innesto

T3 a 9 mesi dall' innesto

Analisi istomorfometrica

	T1 (+ 3 mesi)		T2 (+5 mesi)		T3 (+ 9 mesi)	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
OSSEO MATURO	0%	27,52%	10,46%	42,37%	31,28%	45,23%
OSSEO IMMATURO	19,63%	5,60%	24%	2,14%	1,17%	0%
TESS. FIBROSO	68,29%	0%	32,04%	0%	0%	0%

Complicanze del sito donatore (cresta iliaca) su 20 Pz trattati con PRP + osso autologo:
 1 caso di parestesie permanenti, 1 frattura cresta iliaca

Platelet-rich Plasma in Sinus Augmentation Procedures: a Systematic Literature Review: Part II

Arora NS et al, Implant Dentistry 2010, 19(2):145

Rif. Bibliografico	N.ro Pz	Biomateriali	Risultati	Commenti
Conscio, 2007	16	Innesto auto	Vantaggio solo nei primi 7 mesi	Maturaz.ossea precoce favorisce posiz.impianti
Thor, 2005	19	Innesto auto	Identico "survival rate" impianti	PRP non accelera l'osteointegrazione degli impianti
Kassolis, 2005	10	FDBA	Aumentata rigeneraz. ossea	Non vantaggi clinici
Raghoobar, 2005	5	Innesto auto	Guarigione accelerata ma non differenze nell'istologia osso	Posizionamento precoce impianti
Wiltfang, 2003	39	TCP	Aumentata rig ossea: 38% vs 29%	Limitati benefici clinici

Platelet-rich Plasma in sinus Augmentation Procedures: a Systematic Literature Review: Part II

Arora NS et al, Implant Dentistry 2010, 19(2):145

CONCLUSIONI

- ❑ L'uso del PRP facilita la manipolazione e il posizionamento degli innesti ossei ed accelera la guarigione dei tessuti molli e duri
- ❑ Non dimostrato un vantaggio statisticamente significativo nella rigenerazione ossea o un beneficio clinico evidente tale da supportarne l'utilizzo

The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review

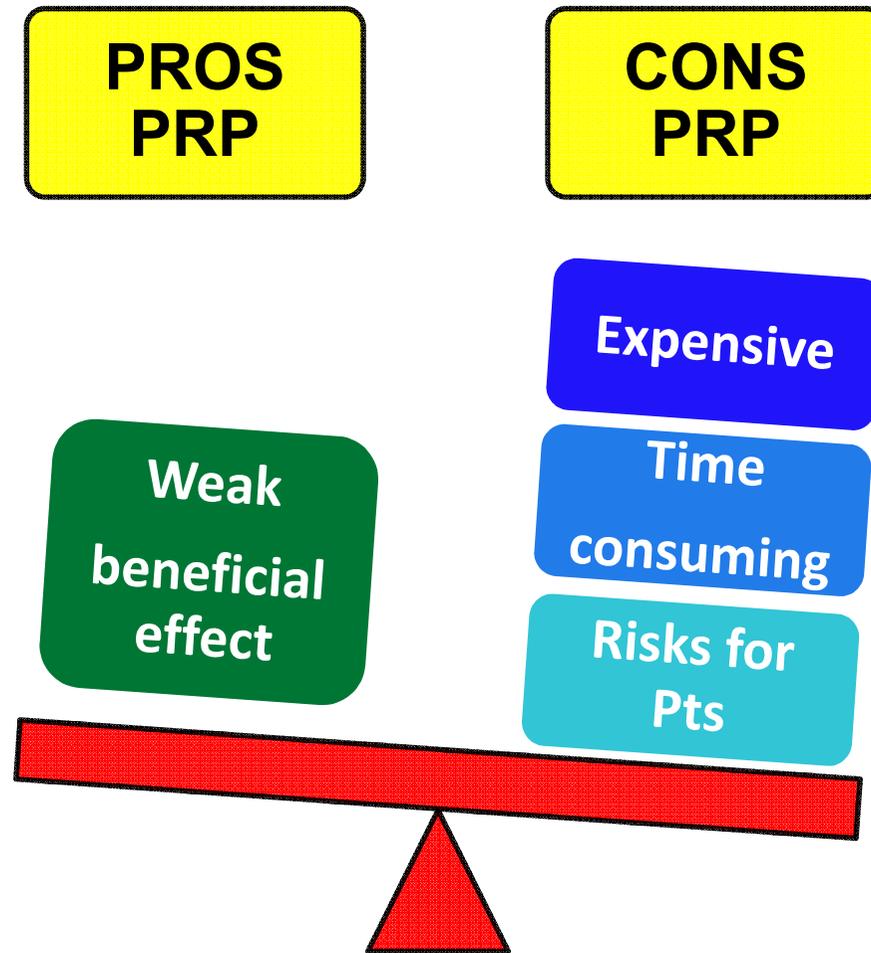
Nikolidakis D et Al., Tissue Engineering: Part B Vol 14, N. 3; 2008

Criticità nella valutazione dei risultati degli studi

- ❑ Utilizzo di differenti modalità di preparazione del PRP (concentrazioni piastriniche dei prodotti non omogenee, presenza/assenza di leucociti e uso di attivatori differenti)
- ❑ Dati Insufficienti/Assenti sulle modalità/device impiegati per la preparazione del PRP
- ❑ Impiego di molteplici biomateriali/sostituti osso in associazione al PRP
- ❑ Assenza follow up a lungo termine (i Pz. afferiscono alle strutture ospedaliere solo per la fase chirurgica e si rivolgono a studi privati per la successiva riabilitazione protesica)
- ❑ Criteri di valutazione della rigenerazione ossea eterogenei con carente valutazione istologica del tessuto rigenerato .

The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review

Nikolidakis D et Al., Tissue Engineering: Part B Vol 14, N. 3; 2008



The Biology of Platelet-Rich Plasma and Its Application in Oral Surgery: Literature Review

Nikolidakis D et Al., Tissue Engineering: Part B Vol 14, N. 3; 2008

In summary, it is unclear to what extent the use of PRP may enhance the bone regeneration process better than other, less-complicated, treatment modalities in oral surgery. Based on animal and human studies, the additional use of PRP in dental surgical procedures may not be recommended at this moment.

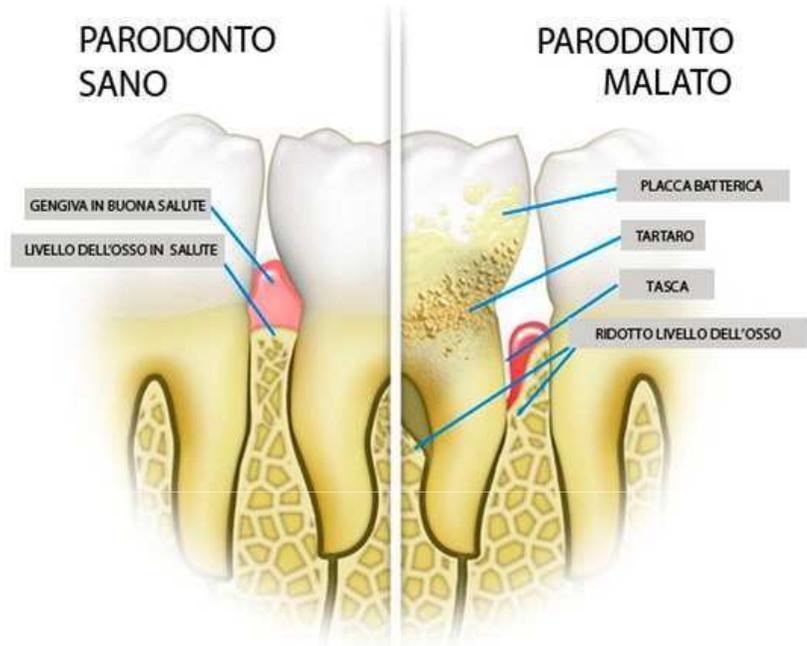
PRP e difetti ossei periodontali

Il parodonto rappresenta il tessuto di supporto al dente ed include :

- ❑ la gengiva,
- ❑ il legamento parodontale,
- ❑ il cemento radicolare,
- ❑ l'osso alveolare e basale



PRP e malattia parodontale



Clinicamente si manifesta con:

- perdita di tessuto osseo e di attacco parodontale,
- formazione di tasche,
- recessioni gengivali.

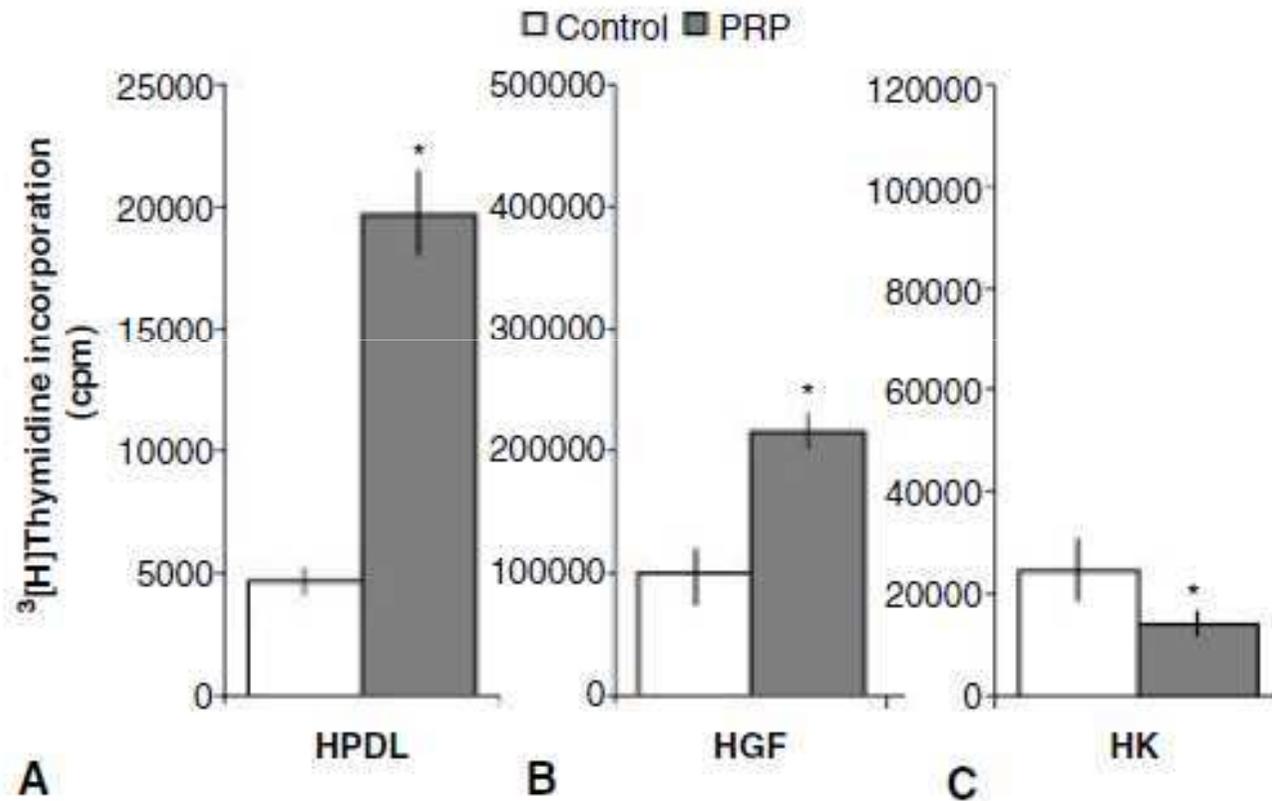
La terapia con PRP è finalizzata alla rigenerazione di tutti i tessuti specifici:

- osso alveolare
- legamento parodontale
- cemento

e ad evitare la guarigione per riparazione (invaginazione dell'epitelio)

In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma

Annunziata M, J Periodont Res 2005; 40; 489–495



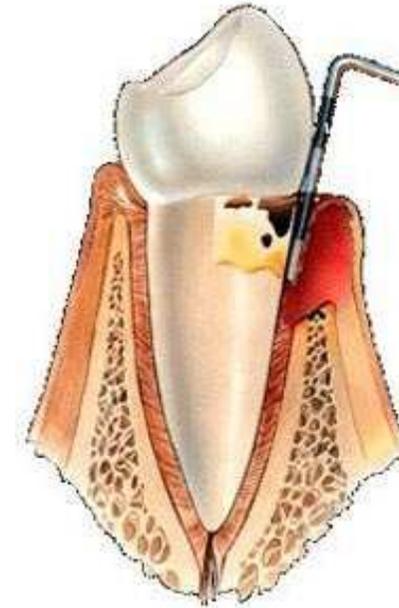
HPDL= cell. del legamento periodontale

HGF= fibroblasti gengivali

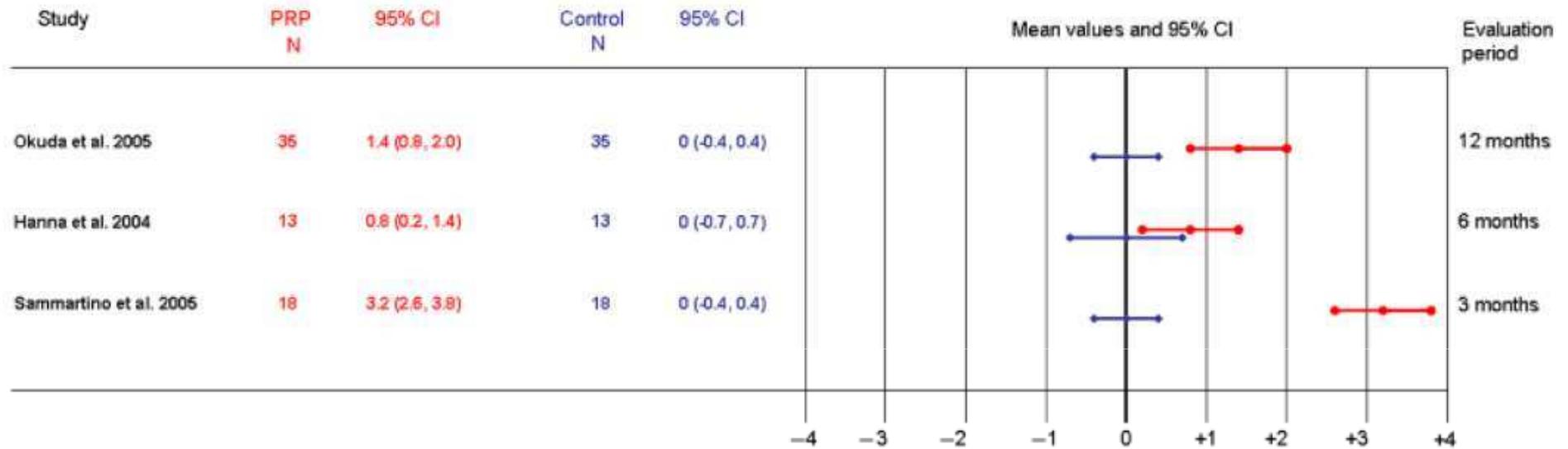
HK= cheratinociti

Valutazione rigenerazione tessuti parodontali

- Misurazione di :
 - CAL (clinical attachment level)
 - profondità di sondaggio
 - recessione gengivale
- valutazione radiologica dei tessuti duri
- esame istologico.



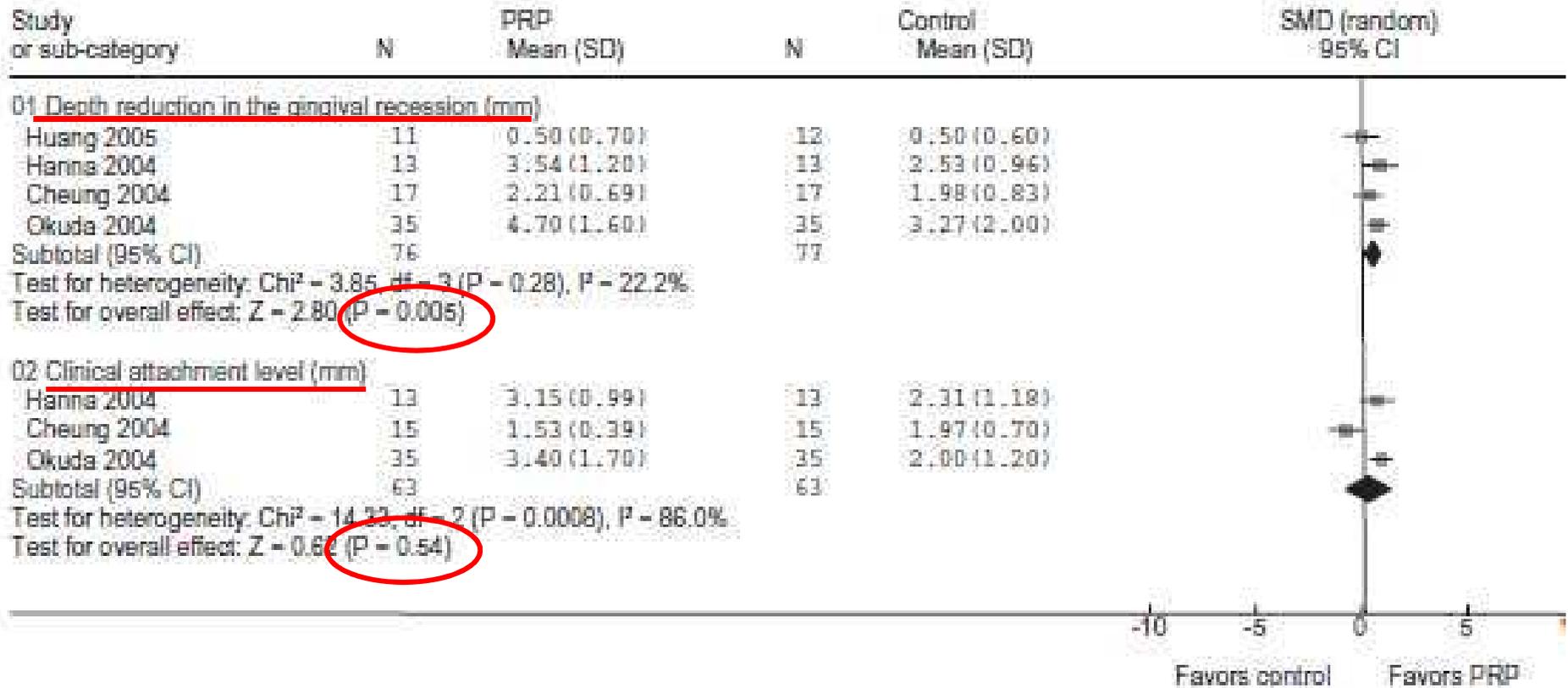
PRP nei difetti ossei periodontali



The results of Δ CAL in mm are presented.

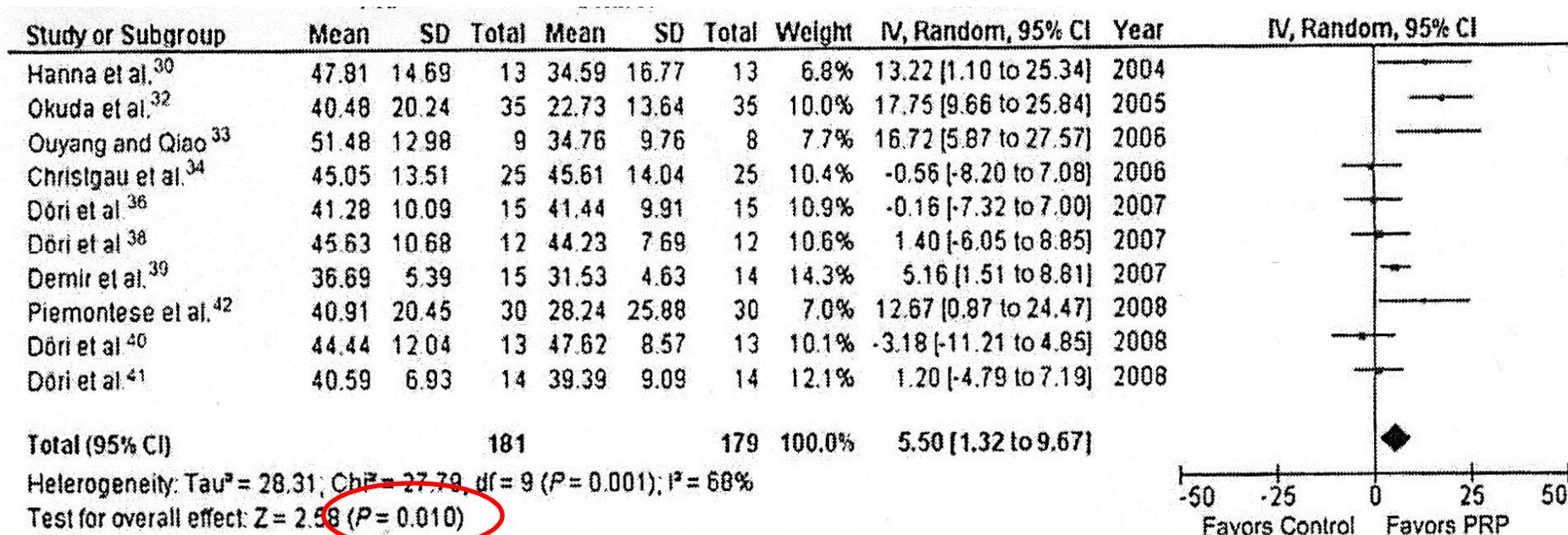
The means of the controls were set on 0. Plus (+) values show a favorable effect of PRP

Efficacy of PRP in chronic periodontitis



Is Platelet Concentrate Advantageous for the Surgical Treatment of Periodontal Disease? A Systematic Review and Meta-Analysis

Del Fabbro M et al, J Periodontol 2011;82:1100-1111



CAL gain in the treatment of periodontal intrabony defects

PRP – Applicazioni particolari

- ❑ Prevenzione osteonecrosi in siti post estrattivi di Pz. in trattamento con Bifosfonati per osteoporosi (*Torres J et al, 2008*)
- ❑ Ricostruzioni mascellari post osteonecrosi da bifosfonati (*Marx RE, 2009-Mozzati M, 2012*)
- ❑ Trattamento di difetti ossei mascellari in Pz. sottoposti a Radio Terapia (favorisce guarigione/rigenerazione e prevenire osteonecrosi) (*Hibi H, 2006*)
- ❑ Siti post estrattivi in Pz. in TAO (Prevenzione sanguinamento post chirurgico) (*Della Valle A, 2003*)

BRONJ (Bisphosphonate – Related Osteonecrosis of the Jaw)

Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A report of 32 cases

Marco Mozzati, Giorgia Gallesio *, Valentina Arata, Renato Pol, Matteo Scoletta

Oral Oncology 48 (2012) 469–474

Approccio chirurgico: resezione osso necrotico, riempimento del difetto osseo con PRGF ed apposizione di membrana di PPGF

Casistica

Location of BRONJ	Mandible	24
	Maxilla	8
Cause for BRONJ	Tooth extraction	17
	Ill-fitting dentures	7
	Periodontal disease	8
Pain	+	20
	-	12
Presence of pus	+	15
	-	17
Exposed/necrotic bone	+	21
	-	11
Oral fistulas	+	15
	-	17
Treatment result	+	32
	-	0



Conclusioni I : PRP in ch. orale e maxillo facciale

Indicazioni Evidence Based

1. Efficacia significativa nella rigenerazione ossea dei **difetti periodontali**
2. Modesto (non significativo) beneficio rigenerativo nella procedura chirurgica di **Sinus Lift**, non associato a vantaggi sul piano clinico
3. Non evidenze a favore del PRP nelle **altre indicazioni odontostomatologiche** in cui è stato sperimentato (implantologia/osteointegrazione/siti post estrattivi)
4. Da validare l'impiego in Pz. con capacità di guarigione tissutale compromesse da terapie farmacologiche o fisiche (bifosfonati, radioterapia)

Platelet Rich Fibrin (PRF)

Un concentrato piastrinico di “seconda generazione”

Messo a punto in Francia da Choukroun et al., nel 2001

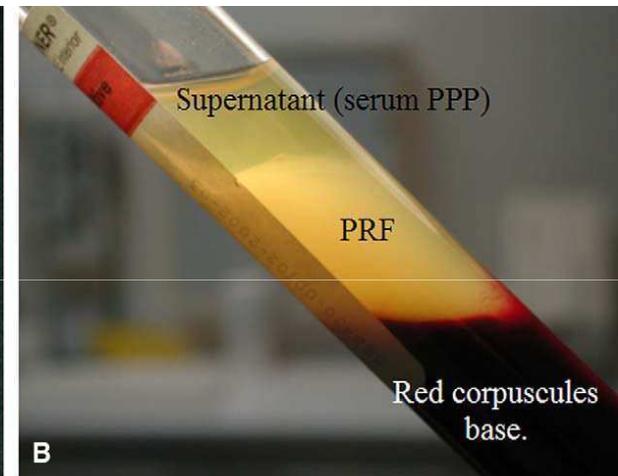
Prelievo in provette (10ml) a superfici in vetro, senza anticoagulante.

CARATTERISTICHE del PRF:

Contiene:

- il 97% delle piastrine
- più del 50% dei leucociti
(+++ linfociti)
- Cellule staminali del prelievo di partenza (Dohan MD, 2009)

Fine network fibrinico che conferisce flessibilità ed elasticità e supporta la migrazione cellulare e il rilascio dei GFs
(Prakash S, 2011)



PRF e rigenerazione ossea

Current Knowledge and perspectives for the use of PRP and PRF in oral and maxillofacial surgery. Part I and Part II

Simonpieri A, Del Corso M et al, 2012 Curr Pharma Biotechnol (13):1207

Studi in vitro : il PRF stimola la proliferazione e differenziazione di osteoblasti e cellule staminali mesenchimali midollari con effetto dose dip. (Dohan DM,2009)

Studi nell'uomo: PRF da solo o associato ad innesti alloplastici (FDBA) induce una più rapida rig ossea nelle procedure di sinus lift e di rig osso alveolare rispetto ai controlli (no PRF)

Utilizzato come biomateriale di riempimento di difetti ossei o come membrana all' interfaccia di rigenerazione ossea/gengivale (**Natural Tissue Regeneration** = Contemporanea rigenerazione del tessuto osseo e gengivale)

Conclusioni: *il PRF, dopo un'estesa validazione dei protocolli d'uso, potrebbe rappresentare il FUTURO in ch. orale, per l'efficacia clinica unita a bassi costi e facile preparazione/utilizzo*

Tissue-engineered bone

Nuovo modello di “Osso ingegnerizzato” basato sull'impiego di :

- ❑ **CSs adulte** quale sorgente di osteoprogenitori
- ❑ **± osteoinduttori** (PRP/rhGFs)
- ❑ **± scaffolds** (cell/drug delivery system)

PRP e cellule staminali (CSs) adulte : il futuro?

Il **PRP**, nelle sue diverse preparazioni (**fresco, lisato, da sangue periferico, da sangue midollare o cordonale**) ha trovato le seguenti applicazioni :

- ❑ **IN VIVO**: induttore della proliferazione/differenziazione delle CSs adulte di differente origine
- ❑ **IN VITRO** medium per l'espansione in coltura delle CSs adulte in alternativa al siero bovino fetale (FBS)

Cellule staminali mesenchimali (MSCs)

3 Criteri identificativi

(International Society for Cellular Therapy)

1. Adesione alla Plastica in coltura
2. Pattern antigenico di superficie: CD105+ CD 90+ CD 73+
CD45- CD34- CD14-
3. Differenziazione trilineare: osteoblasti /condrociti/ adipociti

Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application

Sensebé L et Al, Vox Sanguinis 2009

....wide range of in vivo effects of MSCs:

- 1. cell replacement*
- 2. immunosuppression*
- 3. trophic effect*

BM-MSCs + PRP

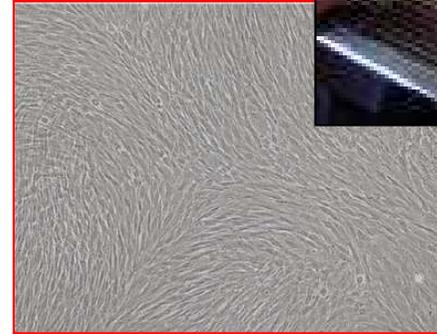


In VIVO

Concentrazione della frazione mononucleata durante la seduta chirurgica (BMAC)

Contenuto: MSCs , CSs e progenitori emopoietici, endoteliali , piastrine etc.

Applicazione **BMAC +PRP**



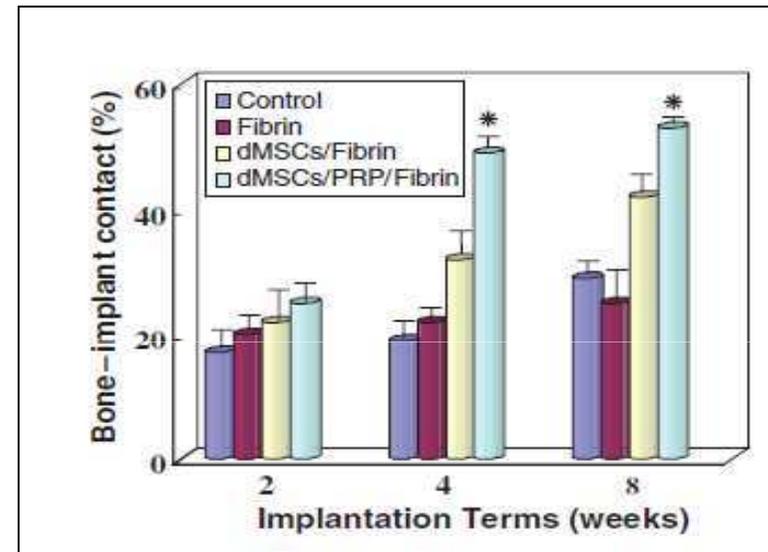
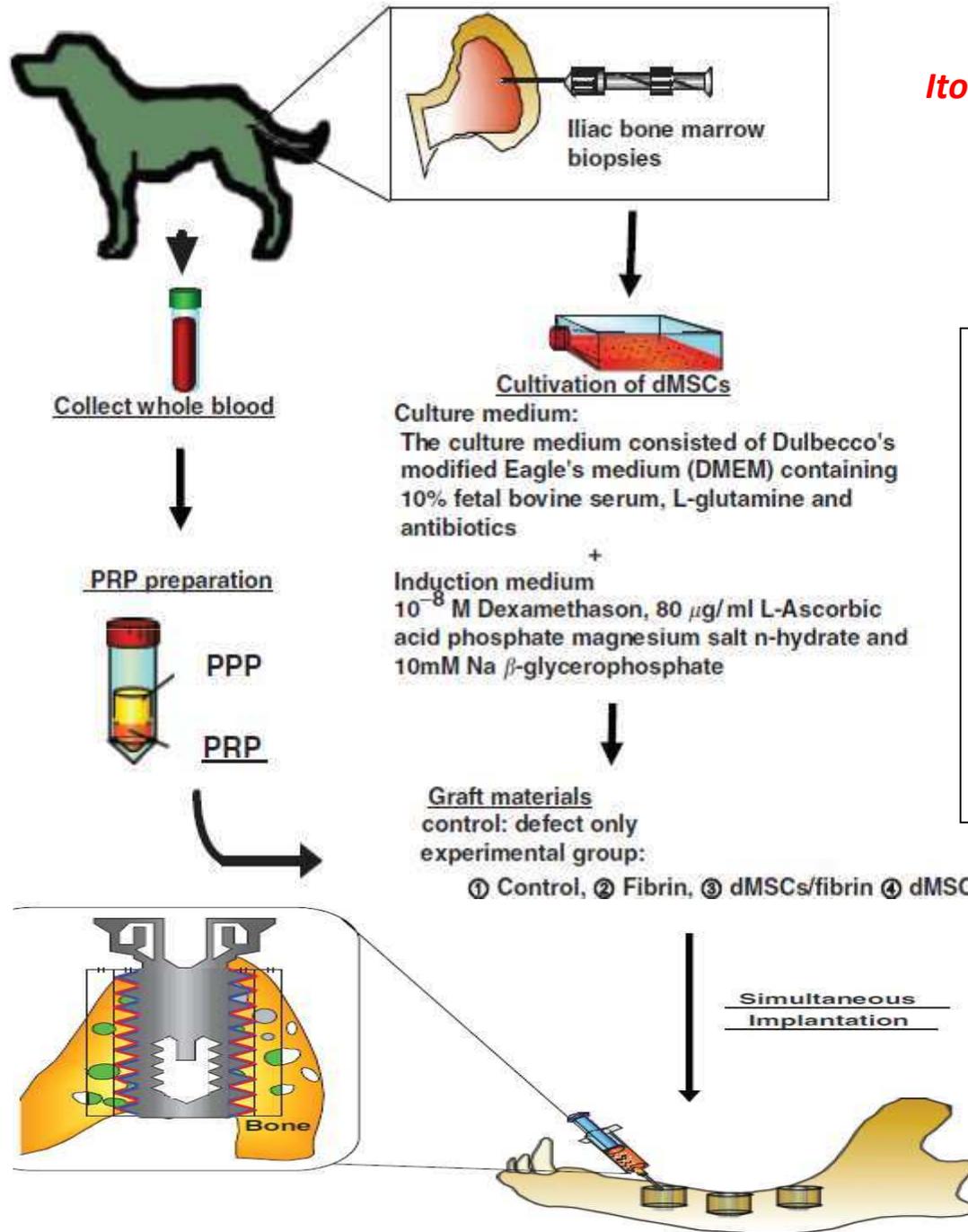
Ex VIVO

Isolamento ed espansione in vitro (**PRP/PL nel medium**)

Laboratorio GMP (terapia avanzata)

Trasferimento in vivo **+PRP**
(2 fasi chirurgiche)

Ito et Al, 2006 Clin Oral Impl Res 17:579

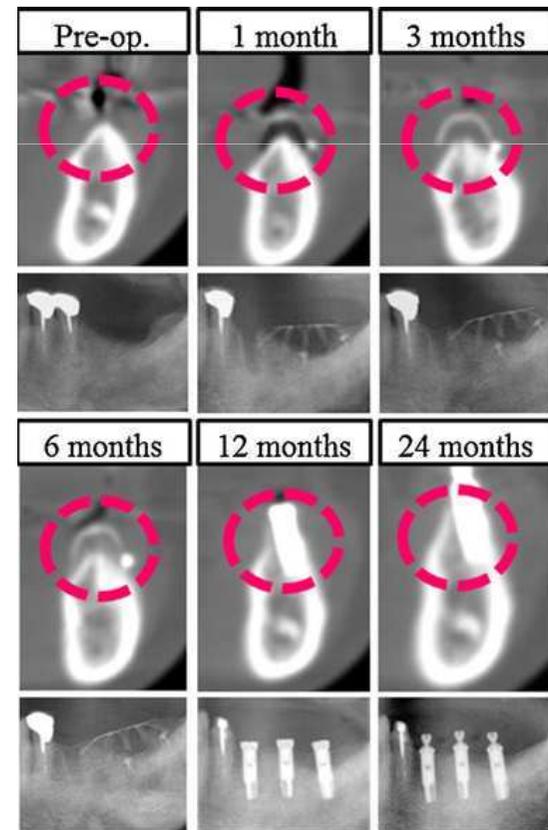
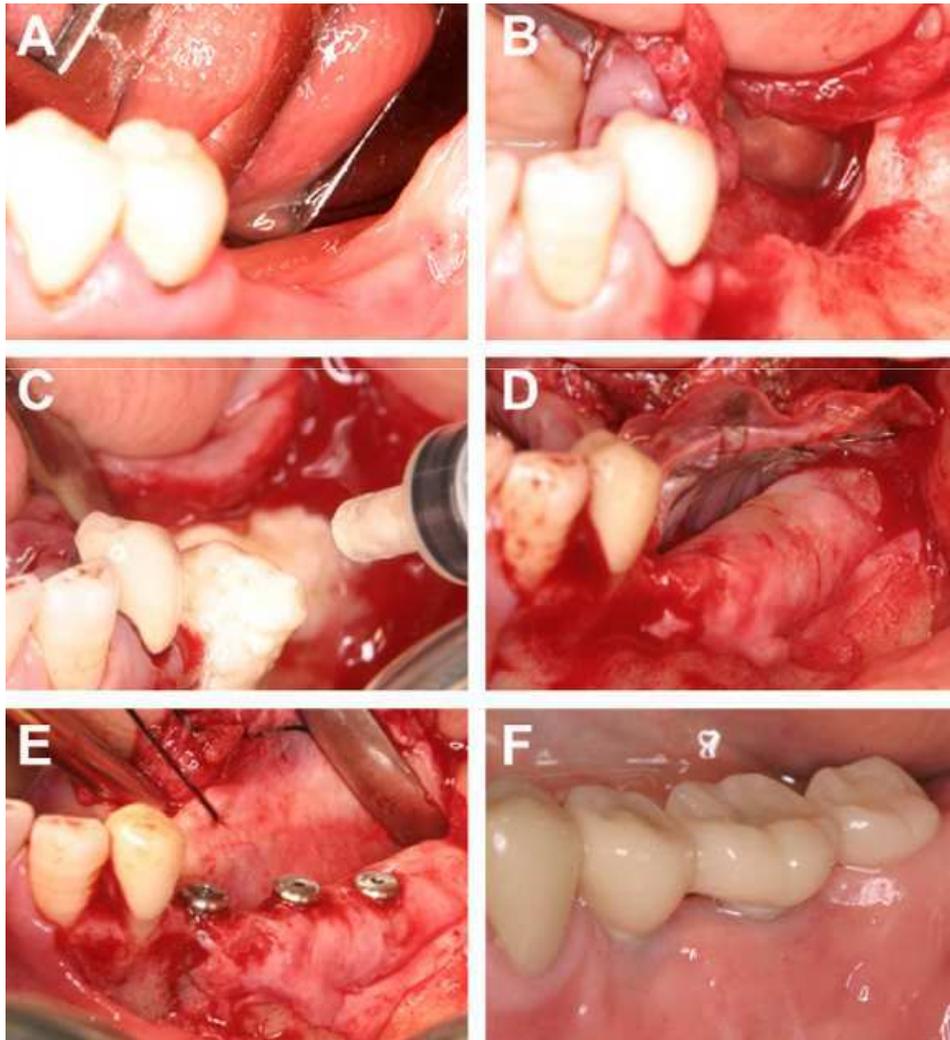


Schema protocollo sperimentale

Minimally invasive approach with tissue engineering for severer bone atrophy case

Yamada Y , *Int J Maxillofac Surg*, 2012 in press

BM-MSCs
PRP
Membrana



Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature

Khojasteh A et al. *J Oral Maxillofac Surg* 2012 ; 70:972-82

Modelli animali:

- la capacità rigenerativa ossea delle BM-MSCs comparabile a quella dell'innesto di osso autologo.
- la coapplicazione del PRP e BM-MSCs offre un vantaggio rigenerativo.
- le BM-MSCs si sono dimostrate efficaci nell'indurre anche rigenerazione dei tessuti periodontali (Legamento periodontale e cemento).

Nell'uomo:

- grande eterogeneità degli studi condotti (condizioni di coltura, scaffolds, osteoinduttori, valutazione outcome)
- Impossibile trarre evidenze conclusive

Sorgenti MSCs in ch. orale e maxillo facciale

Midollo osseo (BM-MSCs) } Più studiate

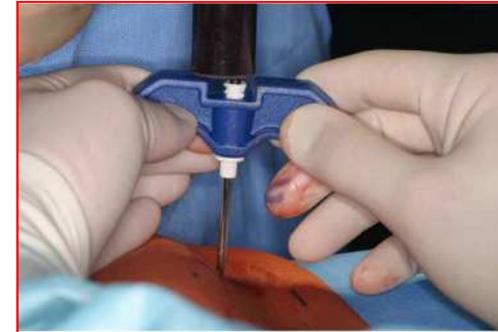
Sangue Periferico

Sangue cordonale

Tessuto adiposo (ADSCs) }

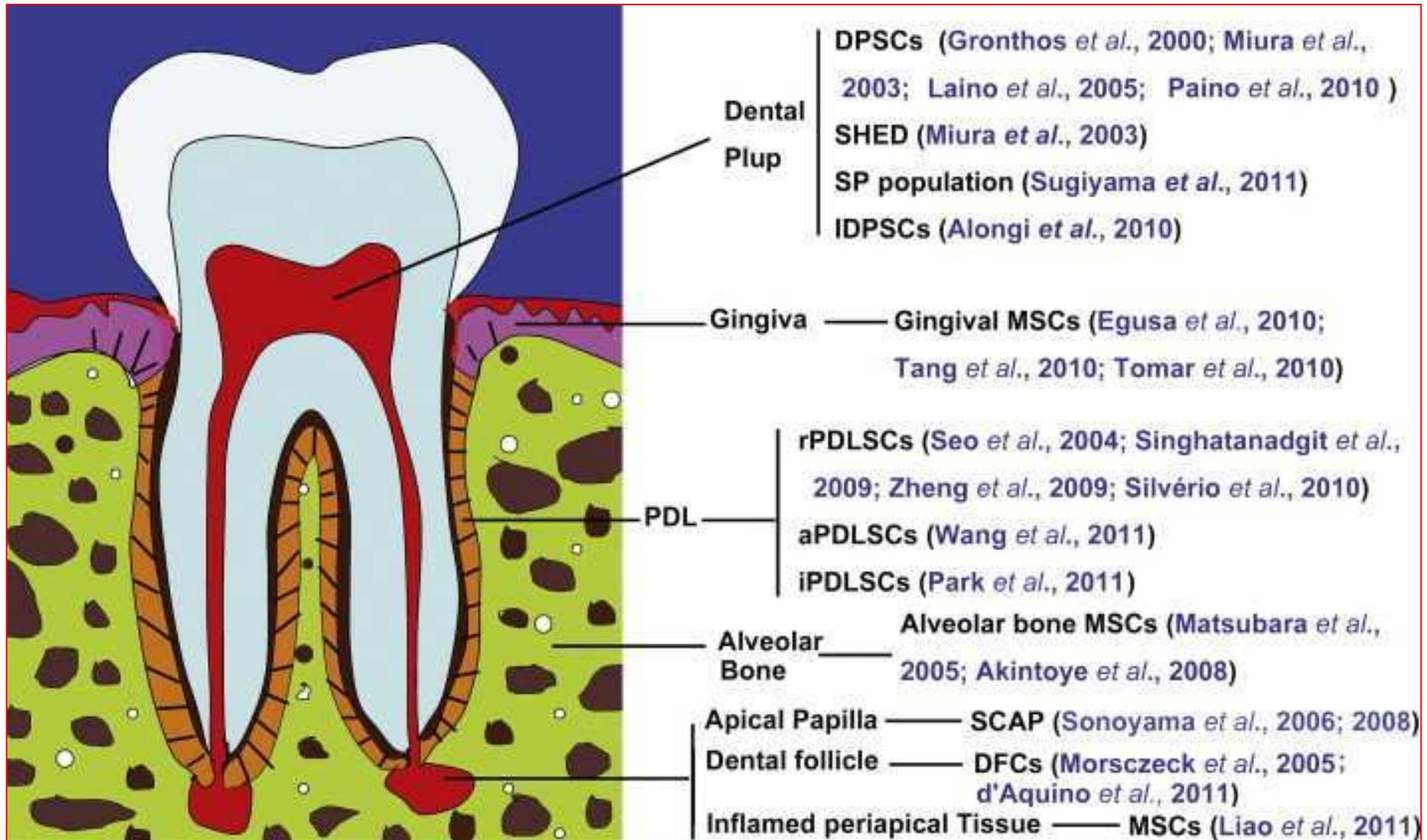
Maggiore disponibilità
Prelievo meno invasivo

Tessuti dentali



CSs derivate da tessuti dentali (Dental stem cells)

- ❑ Cellule staminali della polpa dentaria (**DPSCs**) (Gronthos S *et al*, 2000) :
- ❑ Cellule staminali di denti decidui esfoliati (**SHED o DTSCs**) (Miura et Al, 2003)
- ❑ Cellule staminali del legamento parodontale (**PDLSCs**)
- ❑ CSs del follicolo dentario (**DFSCs**)
- ❑ Cellule staminali della papilla apicale (**APSCs**)



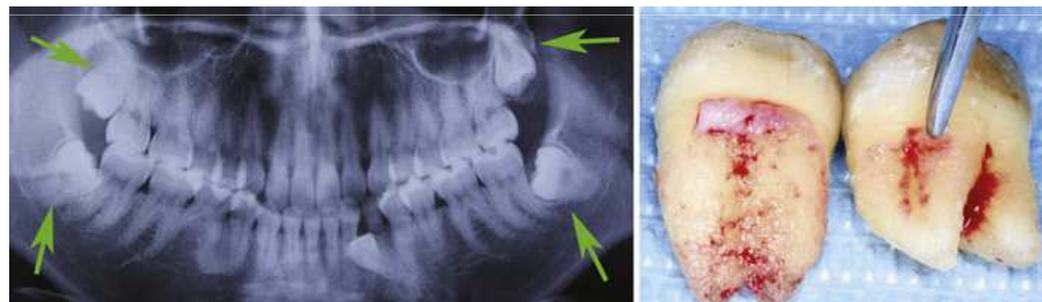
Tratta da Chen FA et Al, *Biomaterials* 2012 (33) 6320-44



**Exfoliated
deciduous
teeth**



**Teeth extracted
for orthodontic
reason**

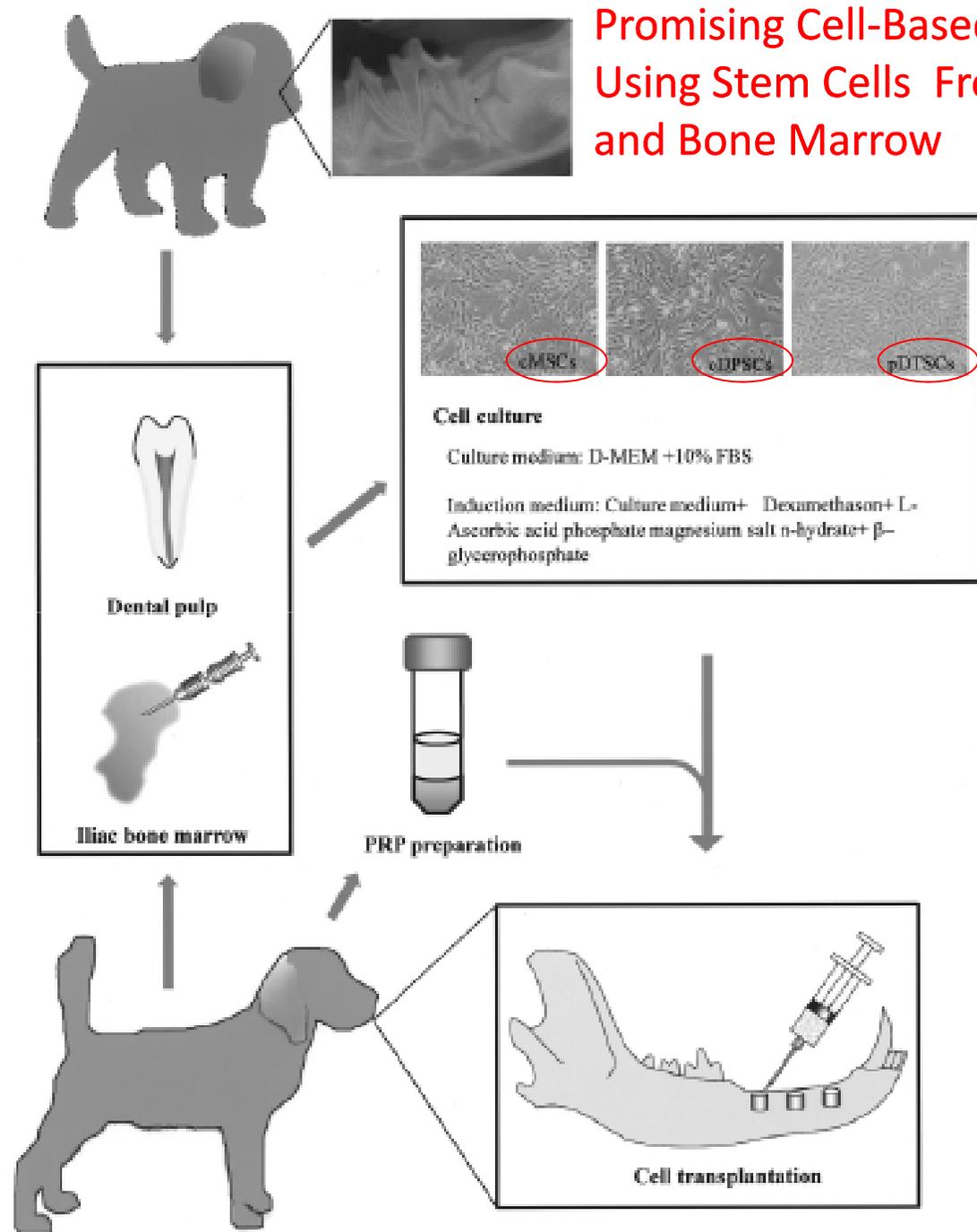


**Impacted third
molars in young
population**



**Teeth extracted for
irreversible
periodontitis reasons**

*Tratta da "Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration"
Chen FA et Al, Biomaterials 2012 (33) 6320-44*



Cell Transplantation, Vol. 20, pp. 1003–1013, 2011

Difetti mandibolari critici vengono riempiti con i seguenti innesti:

- PRP da solo
- BM-MSCs (autologhe)/PRP
- DPSCs (autologhe) /PRP
- DTSCs (allogeniche) /PRP
- controllo (nessun innesto).

Promising Cell-Based Therapy for Bone Regeneration Using Stem Cells From Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow

Yoichi Yamada,* Kenji Ito,† Sayaka Nakamura,† Minoru Ueda,† and Tetsuro Nagasaka‡

Cell Transplantation, Vol. 20, pp. 1003–1013, 2011

Histomorphology Data

	2 Weeks (%)	4 Weeks (%)	8 Weeks (%)
Control	6.9 ± 5.3	17.7 ± 2.6	19.0 ± 2.9
PRP	7.8 ± 2.8	19.8 ± 2.8	19.7 ± 6.0
cMSCs/PRP	15.3 ± 3.2	35.6 ± 4.7	52.8 ± 3.5
cDPSCs/PRP	8.5 ± 1.8	37.4 ± 7.4	61.6 ± 1.3
pDTSCs/PRP	13.8 ± 6.3	25.5 ± 1.1	54.7 ± 2.2

* $p < 0.05$.

† $p < 0.001$.

RISULTATI: a 8 settimane dall'innesto i difetti ossei in presenza di solo PRP e di controllo sono riempiti prevalentemente da tessuto connettivo, al contrario si evidenzia la presenza di osso lamellare nei difetti trattati con innesti di PRP associato alle 3 sorgenti di CSs, senza significative differenze tra le sorgenti utilizzate. Non segni clinici di rigetto delle DTCSs allojeniche.

CSs derivate da tessuti dentali : vantaggi

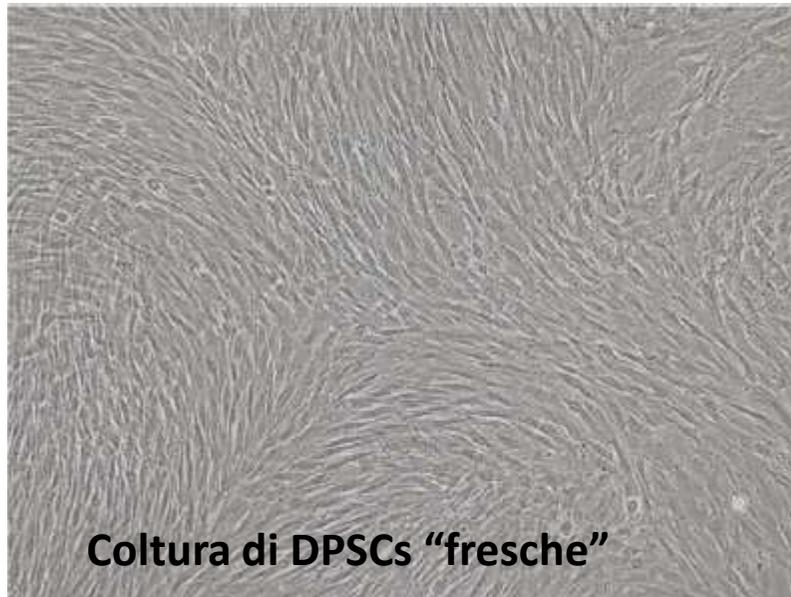
- ❑ Più facilmente accessibili nella comune pratica odontostomatologica
- ❑ Evitano una seduta chirurgica supplementare per il prelievo (aspirato midollare, lipoaspirazione etc.) e la morbidità del sito donatore.
- ❑ Possibile impiego allogenico
- ❑ Possibilità di criopreservazione per uso differito autologo/allogenico, a scopo rigenerativo osseo o di altri tessuti, data la loro dimostrata plasticità.

A novel method for banking dental pulp stem cells

Silvia Gioventù^{a,4}, Gabriella Andriolo^{b,1,4}, Ferruccio Bonino^{c,2}, Stefania Frasca^{b,3},
Lorenza Lazzari^b, Elisa Montelatici^b, Franco Santoro^a, Paolo Rebulla^{b,*}

Transfusion and Apheresis Science 47 (2012) 199–206

- ❑ Criopreservazione di denti decidui dopo “laser piercing”
- ❑ Evita l'estrazione e purificazione delle DPSCs pre criopreservazione
- ❑ Abbattimento dei tempi e dei costi del bancaggio



Tooth Cell Bank

Raccolta e imballaggio



PRP/PL(Patelet Lysate) medium di coltura di MSCs

Il **Fetal Calf Serum** (FCS) viene comunemente impiegato nel medium di coltura delle MSCs, con un **rischio** di immunizzazione e trasmissione zoonosi e malattie da prioni.

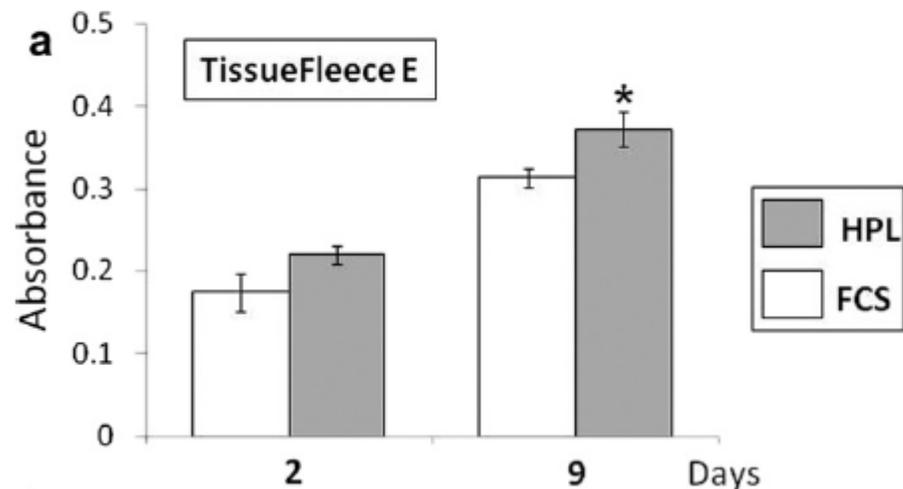
Il **PRP** e, più recentemente, il **PL (Platelet Lysate)**, si sono dimostrati:

- un' efficace alternativa al FCS,
- esenti dai rischi menzionati,
- parimenti in grado di preservare il potenziale differenziativo osteogenetico delle MSCs, sia di derivazione midollare che dal tess. adiposo e da CSs di derivazione dentale.

La concentrazione ottimale del PRP e del PL (5%-10%) è tutt'ora oggetto di studio.

A clinically-feasible protocol for using human platelet lysate and mesenchymal stem cells in regenerative therapies

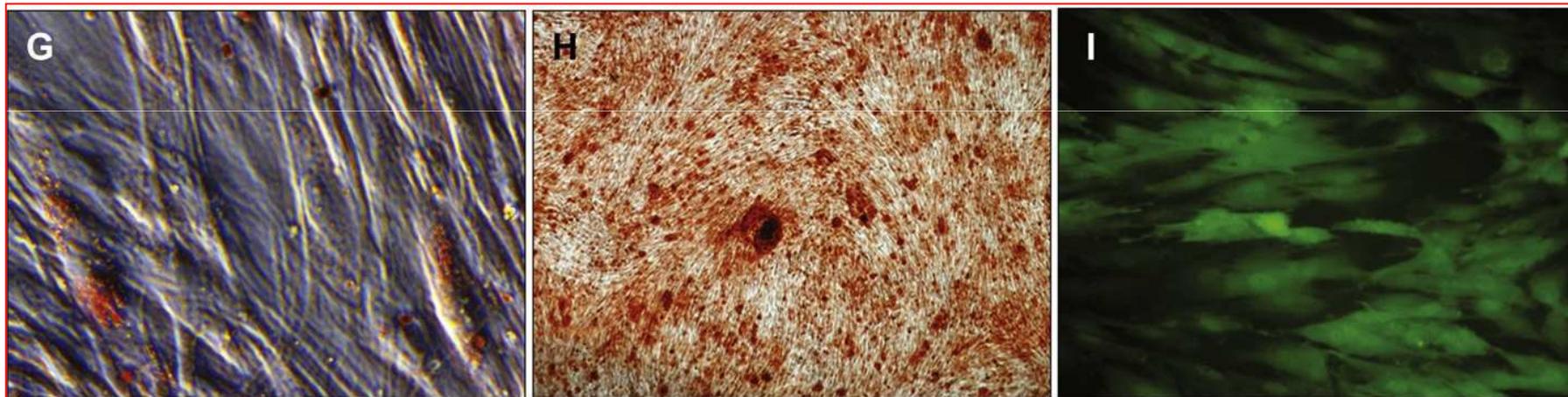
BM-MSCs + HPL + scaffolds vs BM-MSCs + FCS + scaffolds



The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars

Bo Chen et Al, Biomaterials 2012 ,33:5023-35

Adipogenic and odontogenic/osteogenic differentiation of DPSCs
Cultured in 5% Platelet Lysate



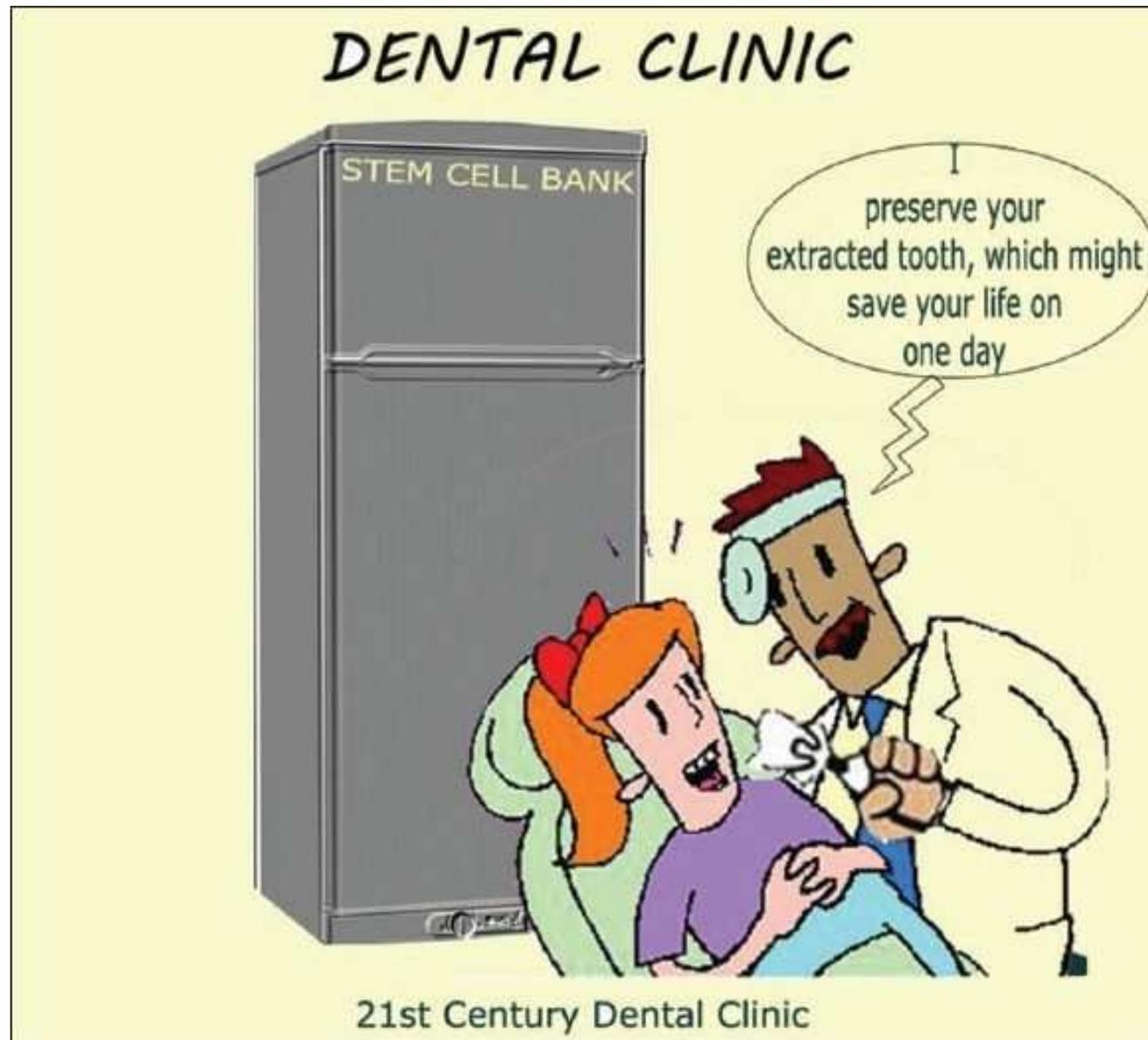
(G) positive staining for lipid droplets with Oil-Red O

(H) positive staining for mineral nodules with Alizarin red

(I) positive staining for dentin sialoprotein (DSP)

Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components

Thus it is possible to use PPC at the end of their shelf-life (in Germany, currently 4 days starting at midnight of the day of donation) if they are not required for transfusion. This approach allows the use of PPC either for therapeutic platelet transfusion or as starting material for preparation of PL.



Where will the stem cells lead us? Prospects for dentistry in the 21st century
J Indian Soc Periodontol. 2011 Jul-Sep; 15(3): 199–204.

Conclusioni II: PRP in ch. orale e maxillo facciale Bench to bedside?

1. A fronte di una pletora di studi in vitro e preclinici, le applicazioni sull'uomo sono ancora limitate.
2. I maggiori ostacoli alla applicazione clinica sono rappresentati dai costi e dai tempi per l'espansione ex vivo (laboratori GMP)
3. Gli interrogativi (quale la sorgente migliore di CSs? Quali gli scaffold da impiegare? Uso esclusivamente autologo o anche allogeneico?) sono più numerosi delle risposte che siamo in grado di dare.
4. Non possiamo affermare che l' "osso ingegnerizzato" rappresenti lo stato dell'arte della rigenerazione ossea in odontostomatologia nel XXI secolo.