

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIRURGICHE

**Problematiche ricostruttive in chirurgia maxillo-facciale:
Nuove linee di ricerca**

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 06-E3

Settore Scientifico disciplinare: MED 29

**La preparazione del sito implantare tramite tecnica piezoelettrica o
tecnica convenzionale: studio clinico pilota.**

Dott.ssa Elisabetta Vignudelli

Coordinatore

Prof. ssa Annalisa Patrizi

Relatore

Prof. Claudio Marchetti

Esame finale anno 2017

INDICE

1. Introduzione	pag. 4
1.1 Razionale ed ipotesi dello Studio	
2. Obiettivi dello studio	pag. 9
2.1 Obiettivo primario	
2.2 Obiettivi Secondari	
2.3 Risultati attesi	
3. Materiali e Metodi.....	pag. 12
3.1 Disegno dello studio	
3.2 Popolazione dello studio	
3.3 Criteri di inclusione e di esclusione	
3.4 Aspetti Etici	
3.5 Randomizzazione ed assegnazione	
3.6 Trattamento	
3.7 Visite e follow-up	
3.8 Materiali utilizzati e loro fornitura	
3.8.1 Impianti dentali	
3.8.2 Sistema d inserti piezoelettrici	
3.9 variabili valutate	
3.9.1 Tipologia ed incidenza di complicanze post-operatorie	
3.9.2 Valutazione della densità ossea	
3.9.3 Valutazione della stabilità primaria	
3.9.4 Valutazione della rigenerazione ossea	
3.10 Gestione dei dati	
3.11 Analisi statistica	
4. Risultati	pag. 31
4.1 Popolazione intent-to-treat	
4.2 Popolazione pre-protocol	
4.3 Impianti	

4.4 Complicanze chirurgiche, densità ossea e stabilità primaria

4.5 Valutazione qualitativa della rigenerazione ossea

4.6 Valutazione quantitativa della rigenerazione ossea

5. Discussione pag. 46

6. Conclusioni pag. 57

7. Bibliografia..... pag. 56

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1. INTRODUZIONE

L'implantologia osteointegrata è, oggi, un'opzione terapeutica largamente usata per la riabilitazione di edentulie singole, parziali o totali con alte percentuali di successo sia da un punto di vista funzionale che estetico (Leonhardt ET AL. 2002, Karoussis ET AL. 2004, Kazor et al. 2004, Garber et al. 1995).

Seppur ben documentata in letteratura, questa tecnica può presentare dei rischi quali la possibilità di danneggiare tessuti molli, strutture anatomiche nobili e la possibilità di generare una necrosi ossea a causa del surriscaldamento osseo intraoperatorio (Siervo et al. 2004, Sanmartino et al. 2011).

La chirurgia piezoelettrica è una promettente tecnica per il taglio dei tessuti duri che pare essere in grado di superare i limiti della strumentazione tradizionale nel campo della chirurgia ossea (Pereira et al. 2004; Vercellotti et al. 2004, 2014).

Il dispositivo piezoelettrico è una macchina ad ultrasuoni che utilizza una frequenza di 25-30 kHz. A questa frequenza è in grado di tagliare unicamente i tessuti mineralizzati risparmiando i tessuti molli che necessitano invece una frequenza superiore ai 50 kHz. Quando usato correttamente, il dispositivo piezoelettrico non è in grado di incidere la membrana schneideriana del seno mascellare, né strutture vascolo-nervose o periostee e può quindi essere utilizzato durante le chirurgie che prevedono l'avvicinamento a tali strutture nobili (Schlee 2006).

In aggiunta altri vantaggi della chirurgia piezoelettrica sono la miglior visibilità intraoperatoria ed il taglio netto e preciso. Il motivo del primo vantaggio risiede nel cosiddetto effetto cavitazione, cioè la capacità dello strumento di creare uno spray di aria-acqua che deterge l'alveolo (Schlee 2006).

Il motivo del secondo vantaggio risiede nella minor vibrazione della punta dello strumento e nella minor pressione richiesta all'operatore durante le fasi di taglio che comporta anche un notevole aumento della sensibilità manuale intraoperatoria (Schlee 2006).

In ragione di queste caratteristiche, la chirurgia piezoelettrica è stata applicata negli ultimi anni in molti campi della chirurgia maxillo-facciale ed orale come la chirurgia dei terzi molari (Monaco et al. 2014), la chirurgia ortognatica (Ueki et al. 2004) la chirurgia pre-protetica (Vercellotti et al. 2000, 2001; Sohn et al. 2007; Wallace et al. 2007, Happe et al. 2007, Danza et al. 2009, Bovi et al. 2010).

Un campo di applicazione della piezochirurgia relativamente nuovo è l'implantologia e, più nel dettaglio, la preparazione del sito implantare. Sono infatti ad oggi disponibili inserti che permettono la preparazione ultrasonica del tunnel implantare superando quindi la convenzionale metodica che prevedeva l'utilizzo di una sistemica a fresa (Vercellotti et al. 2014; Cucchi et al. 2017).

L'applicazione della chirurgia piezoelettrica in campo implantare permette di sfruttare tutti i vantaggi già elencati, diminuendo in maniera significativa il rischio di danno iatrogeno a strutture nobili (Wallace et al. 2007 *Schaeren et al. 2008*), riducendo la necessità di ricorrere a chirurgie pre-protetiche e velocizzando la riabilitazione di edentule totali o parziali (Stacchi et al. 2013).

In aggiunta, studi recenti sembrano dimostrare la capacità della piezochirurgia di modificare le fasi iniziali del processo di guarigione ossea e dell'osteointegrazione (Preti et al. 2007) anche se i dati presenti in letteratura sono discordanti (Esteves et al. 2013, Vercellotti et al. 2005, Kfoury et al. 2013).

Al momento non esistono studi istologici su uomo. Per quanto riguarda il modello umano le eventuali modifiche sul processo di osteointegrazione sono state studiate da un punto di vista della stabilità primaria (Stacchi et al. 2013). Il successo implantare a lungo termine è infatti una combinazione di stabilità primaria e secondaria. La stabilità primaria è un fenomeno meccanico influenzato da fattori relativi all'impianto (design e dimensioni della fixture), al paziente (qualità ossea) e all'operatore (tecnica di preparazione del sito) ed ha il valore massimo subito dopo il termine della chirurgia per via della compressione della fixture sulle pareti ossee, decrescendo poi con il tempo. La stabilità secondaria è invece un fenomeno biologico dato dalla formazione di nuovo osso intorno e conseguente osteointegrazione della fixture: è assente al momento del posizionamento della fixture e cresce durante i tre mesi post-operatori. La

preparazione del sito implantare con tecnica piezoelettrica sembra comportare una minor diminuzione della stabilità primaria ed un più veloce passaggio dalla stabilità primaria a quella secondaria (Stacchi et al. 2013, Canullo et al. 2013).

Studi da eseguire su modello umano sono quindi necessari al fine di indagare nel dettaglio le potenzialità biologiche della piezo-chirurgia in ambito di preparazione del sito implantare.

1.1 Razionale ed ipotesi della ricerca

La letteratura scientifica ad oggi non è concorde sulla capacità o meno della piezochirurgia di interagire con le prime fase della guarigione ossea in ambito di preparazione del sito implantare. Studi da eseguire su modello umano sono quindi necessari al fine di indagare nel dettaglio le potenzialità biologiche della piezochirurgia in ambito di preparazione del sito implantare.

Il razionale che sta alla base di questa ricerca è quello di capire e verificare se vi siano differenze istologiche nel processo di guarigione su modello umano in seguito a preparazione del sito implantare tramite tecnica piezoelettrica e tecnica convenzionale.

Capitolo 2

OBIETTIVI dello STUDIO

2. OBIETTIVI

2.1 Obiettivo primario

L'obiettivo primario dello studio sarà la valutazione quantitativa e qualitativa della rigenerazione ossea ottenuta in seguito a preparazione del sito implantare tramite tecnica piezoelettrica e tecnica convenzionale. Per ogni caso sarà valutato: la presenza di infiltrato infiammatorio e la tipologia dello stesso, la densità delle cellule mesenchimali presenti, distinguendo quelle che si stanno differenziando in senso osteogenico e la densità vascolare e la relativa morfologia.

2.2 Obiettivo secondario

Inoltre verranno valutate nei due gruppi le complicanze chirurgiche (i.e. lesioni vascolari o lesioni neurologiche) durante l'intervento di inserimento implantare, le eventuali complicanze biologiche post-operatorie (infezioni post-operatorie), la densità dell'osso basale e la stabilità primaria.

2.3 Risultati Attesi

Al momento non sono presenti in letteratura studi su modello umano volti a valutare le variabili di questo studio. Tramite i risultati ottenuti da questa ricerca si potranno ottenere informazioni utili sulla capacità della piezochirurgia di interagire con le fasi della guarigione che seguono l'inserimento implantare. I dati emersi dal gruppo test verranno confrontati con i dati del gruppo controllo con lo scopo di capire se il processo biologico in seguito a chirurgia piezoelettrica è differente rispetto a quello convenzionale. In particolare ci si aspetta di comprendere se la chirurgia piezoelettrica potrebbe essere in grado di ridurre l'entità ed accorciare i tempi della fase infiammatoria post-chirurgica. Se la fase infiammatoria e di conseguenza il processo di guarigione fossero più veloci si aprirebbero nuovi scenari per quanto riguarda il carico protesico degli impianti protesica degli impianti ed il timing di finalizzazione protesica degli stessi. Il successo implantare a lungo termine è infatti una combinazione di stabilità primaria e secondaria. La stabilità primaria è massima subito dopo aver posizionato l'impianto e decresce poi con il tempo mentre la stabilità secondaria è un fenomeno biologico assente al momento dell'inserimento implantare che si sviluppa in seguito all'osteointegrazione della fixture. Il momento di intersezione di queste due fasi è il momento di massima instabilità dell'impianto durante il quale il dispositivo non deve essere trattato. Se la chirurgia piezoelettrica si dimostrasse efficace nella modifica della fase infiammatoria si cambierebbero il timing del carico protesico e le tempistiche critiche dell'impianto.

Capitolo 3

MATERIALI e METODI

3. MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

Lo studio è stato disegnato come uno studio clinico pilota, randomizzato, comparativo, a gruppi paralleli, in singolo cieco, nel quale le variabili sono state analizzate prospetticamente.

Il presente protocollo è stato redatto secondo le linee guide che regolano gli studi randomizzati (CONSORT) (<http://www.consort-statement.org/>).

Nella tabella seguente, sono state riportate le 3 fasi di trattamento, previste nel corso dello studio, che comprende sostanzialmente 2 fasi chirurgiche e 1 fase protesica.

Timing	Fase operativa
Fase T0	Inserimento impianti + inserimento mini fixture
	28 giorni
Fase T1	Espianto mini fixture
	3 mesi
Fase T2	Riabilitazione protesica (carico funzionale)

3.2 Popolazione di studio

Lo studio ha compreso il trattamento di 12 siti edentuli e adatti ad essere riabilitati con terapia implantare. Lo studio ha trattato i pazienti volontari sani che necessitavano di terapia riabilitativa implanto-protetica di almeno un elemento dentario che sono stati trattati tra il 1 Giugno 2016 ed il 1 Giugno 2017 presso il Reparto di Chirurgia Orale, Clinica Odontoiatrica Universitaria, Via San Vitale 59, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università degli Studi Bologna che presentavano alla prima visita i criteri di inclusione fino al raggiungimento di un numero totale di 12 siti. I pazienti che accettavano di prendere parte allo studio, durante le normali procedure di chirurgia implantare ricevevano anche l'inserimento di una fixture implantare di dimensioni ridotte che una volta espantata ed analizzata ha permesso di verificare gli obiettivi primari e secondari dello studio.

I siti sono stati suddivisi in 2 gruppi di studio e assegnati a ciascun gruppo in base alla sequenza di randomizzazione precedentemente computer-generata:

- Gruppo Test: 6 siti trattati tramite inserimento della fixture di dimensioni ridotte con preparazione del sito implantare con tecnica piezoelettrica
- Gruppo Controllo: 6 siti trattati tramite inserimento della fixture di dimensioni ridotte con preparazione del sito implantare con tecnica a fresa convenzionale.

3.3 Criteri di inclusione ed esclusione

I criteri di inclusione allo studio erano:

- pazienti volontari di status A.S.A 1
- pazienti che fumano meno di 10 sigarette/die
- pazienti che necessitano di terapia riabilitativa implanto-protetica di almeno due elementi dentari visitati tra il 1 Giugno 2016 ed il 1 Giugno 2017 presso il Reparto di Chirurgia Orale, Clinica Odontoiatrica Universitaria San Vitale, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università degli Studi Bologna
- pazienti di età compresa tra i 40 e 60
- pazienti che hanno firmato il consenso informato allo studio ed il consenso al trattamento dei dati personali

I criteri di esclusione allo studio erano:

- pazienti che non rispettavano i criteri di inclusione allo studio
- pazienti che si erano sottoposti a precedente chirurgia di incremento osseo nel sito arruolabile
- pazienti fumatori >10 sigarette/die
- Abuso di alcool o stupefacenti;
- Gravidanza;
- Infezione acuta locale o sistemica;
- Diabete non-controllato o altre malattie metaboliche;
- Alterazioni gravi della funzionalità epatica e renale.
- Positività sierologica per HIV, HBV, e HCV.
- Chemioterapia o radioterapia testa-collo negli ultimi 5 anni
- Terapia con bifosfonati nell'ultimo anno.
- Terapia immunosoppressiva.

3.4 Aspetti etici

Il presente studio così come il foglio illustrativo ed il consenso specifico dedicato sono stati sottoposti all'approvazione del Comitato etico locale. Il comitato etico interaziendale bologna-imola ha espresso parere favorevole allo studio in data 17 Giugno 2016 con codice cod. ce: 16053.

A ciascun paziente è stato consegnato una scheda informativa in cui sono illustrati: il tipo di intervento chirurgico; la possibilità che può rendersi necessario modificare il tipo di intervento chirurgico nel corso del suo svolgimento; i biomateriali utilizzati, sia quelli di origine sintetica che quelli di origine animale; le possibili complicanze intra- e post- operatorie; il decorso post-operatorio; i rischi chirurgici connessi all'intervento stesso, oltre a quelli correlati all'anestesia; le percentuali di successo e di insuccesso dell'intervento; le indicazioni e delle controindicazioni all'intervento; e le terapie alternative per la risoluzione della condizione patologica del paziente stesso; oltre a tutte le istruzioni pre- e post-operatorie, che devono essere rispettate per il successo del trattamento. Il foglio informativo spiega anche che il trattamento medico-chirurgico del paziente non sarà assolutamente compromesso nel caso in cui non desideri partecipare.

Inoltre, a ciascun paziente è stato anche consegnato un modulo per consenso informato al trattamento e un consenso al trattamento dei dati personali, che è stato firmato dal paziente e controfirmato dallo sperimentatore prima di qualunque procedura specifica dello studio in oggetto. Il modulo di consenso spiega anche che il paziente è libero di ritirarsi dallo studio in ogni momento e che tale ritiro non comprometterà in nessuna maniera il trattamento medico-chirurgico cui sono sottoposti.

3.5 Randomizzazione ed assegnazione al trattamento

I pazienti che possedevano i criteri di inclusione e di esclusione sono stati randomizzati ad uno dei due trattamenti in studio. L'assegnazione del paziente al trattamento è avvenuta secondo la lista di randomizzazione. Al paziente è stato assegnato un codice di randomizzazione per garantirne l'anonimato e la valutazione in cieco.

3.6 Trattamenti

Il giorno dell'intervento (T0), è stata eseguita una pre-medicazione mediante farmaci analgesici-antiinfiammatori (Nimesulide 100 mg o Ibuprofene 600 mg) e farmaci ansiolitici (diazepam o delorazepam 1-2 mg); ed è stata eseguita un'anestesia locale della sede d'intervento mediante Articaina al 4% con adrenalina 1:100.000.

Dopo avere eseguito l'anestesia, è stata praticata una incisione crestale ed è stato sollevato un lembo muco periosteo con successiva scheletrizzazione della zona arruolata. Si è continuato con la preparazione dei siti implantari in posizione protesicamente guidata, mediante l'uso di frese dedicate; i siti implantari sono stati sotto-preparati al fine di garantire agli impianti un'elevata stabilità primaria con un torque massimo di inserimento > 50 Ncm. Successivamente, si è eseguito l'inserimento degli impianti cilindrici con la piattaforma implantare situata a circa 2-3 mm apicalmente al margine gengivale dei 2 denti adiacenti.

A questo punto il sito arruolato è stato trattato con l'inserimento di n.1 mini fixture aggiuntiva di dimensioni ridotte (D: 3.3, L: 8,5 mm) con metodica differente a seconda che il paziente sia allocato nel gruppo test (A) oppure gruppo controllo (B).

Nel Gruppo Test la preparazione del sito implantare della fixture aggiuntiva è stata eseguita con tecnica piezoelettrica (Piezosurgery, Mectron Medical Technology, Carasco, Italy) e sarà seguita dall'inserimento di una mini fixture di dimensioni ridotte (D: 3.3 , L: 8.5 mm)

Nel Gruppo Controllo la preparazione del sito implantare della fixture aggiuntiva con sistematica convenzionale e verrà inserita una mini fixture implantare di dimensioni ridotte (D: 3.3 , L: 8.5 mm)

A questo punto sono state inserite su tutti gli impianti le viti chirurgiche di chiusura. Infine, si è concluso l'intervento con la chiusura per 1° intenzione dei lembi chirurgici mediante una sutura a materassaio orizzontale e una sutura interrotta a punti semplici.

A tutti i pazienti sono stati prescritti 2 g di Amoxicillina + Acido clavulanico come pre-medicazione, a partire da un'ora prima dell'intervento e per 6 giorni successivi; è stato inoltre prescritto un farmaco anti-infiammatorio non-steroido da prendere al bisogno.

Le istruzioni post-operatorie hanno compreso una dieta morbida per 2 settimane, associata ad igiene orale adeguata mediante 4 sciacqui al giorno con un collutorio a base di clorexidina al 0,2%.

Durante tutto il periodo di guarigione, non è mai stata utilizzata nessuna protesi parziale rimovibile, al di sopra della zona interessata, che potesse in qualche modo interferire con la guarigione delle mucose e dell'osso. I pazienti sono stati visitati a 7 giorni dalla chirurgia implantare per la rimozione delle suture.

In entrambi i gruppi le mini fixture sono state fatte guarire con modalità sommersa per un tempo di 28 giorni. Dopo 28 giorni (T1) le mini fixture sono state espianate tramite fresa carotatrice, ponendo la massima attenzione a non rimuovere ulteriore osso ad eccezione di quello necessario per l'analisi istologica.

Previa anestesia locoregionale con mepicavaina con Mepivacaina 2% + adrenalina 1:100.000 (Pierrel spa, Milano, Italy) è stato allestito un lembo mucoperiosteo che ha permesso l'accesso alla mini fixture implantare. La fixture implantare di dimensioni ridotte è stata espianata con fresa carotatrice e allo scopo di ottenere una carota di tessuto osseo peri-implantare con dimensioni di 0,5mm. I lembi chirurgici sono poi stati suturati per permettere una guarigione della zona per prima intenzione. I pazienti hanno poi ricevuto una dose di anti-infiammatorio (Ibuprofene 600mg oppure Nimesulide 100mg) da prendere

immediatamente dopo la chirurgia e una terapia anti-infiammatoria a base di Ibuprofene 600mg oppure Nimesulide 100mg da assumere secondo necessità nei giorni successivi. Le istruzioni post-operatorie hanno compreso una dieta morbida per 2 giorni, associata ad igiene orale adeguata mediante 4 sciacqui al giorno con un collutorio a base di clorexidina al 0,2%.

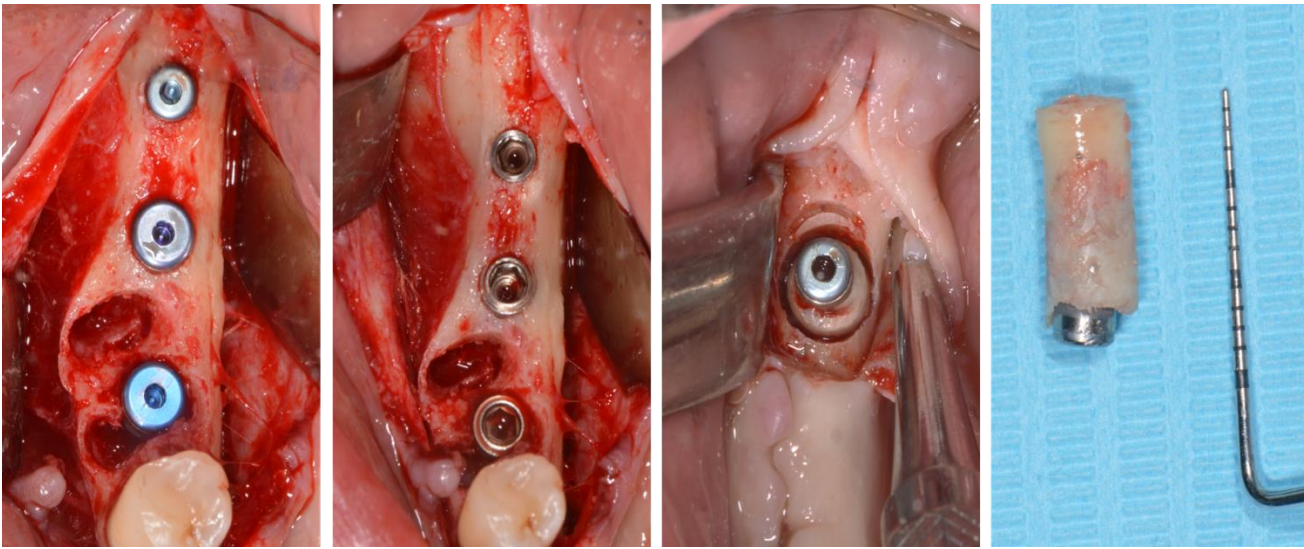
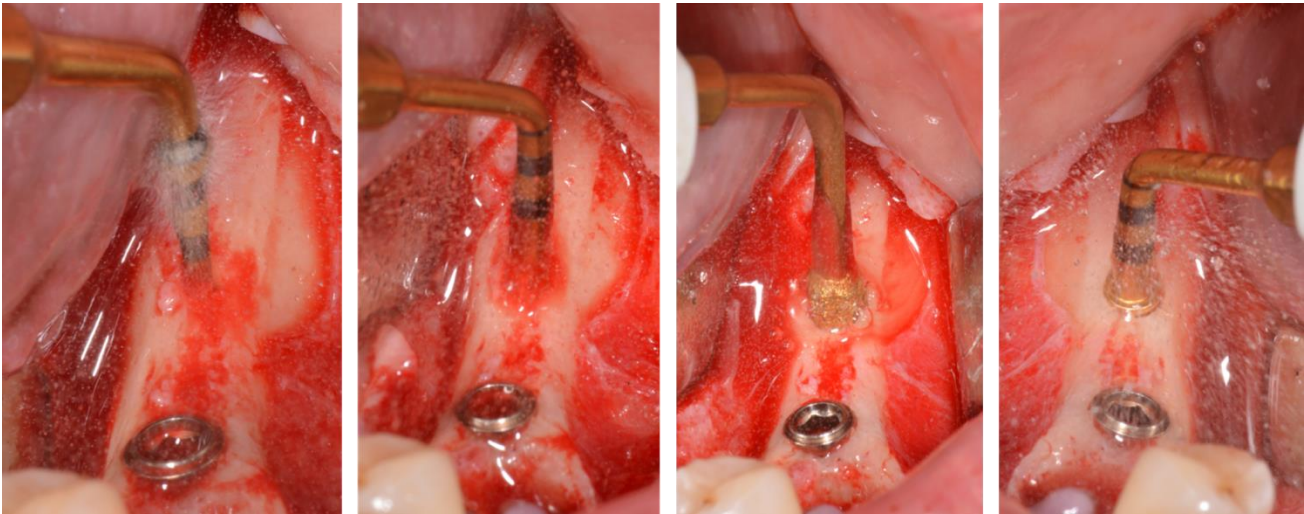
Ad una settimana dalla chirurgia di espianto sono state rimosse le suture.

Dopo 3 mesi (T2), il piano di trattamento ha previsto la riapertura delle fixture implantare rimaste e la realizzazione di una protesi fissa sugli impianti. In particolare, appena dopo la completa guarigione della mucosa peri-implantare attorno alle viti di guarigione (circa 4-8 settimane), è stata presa un'impronta definitiva, da cui è stato sviluppato un modello master, che ha permesso in 4-8 settimane di realizzare una o più corone in metallo ceramica, finalizzando così la protesizzazione degli impianti stessi.

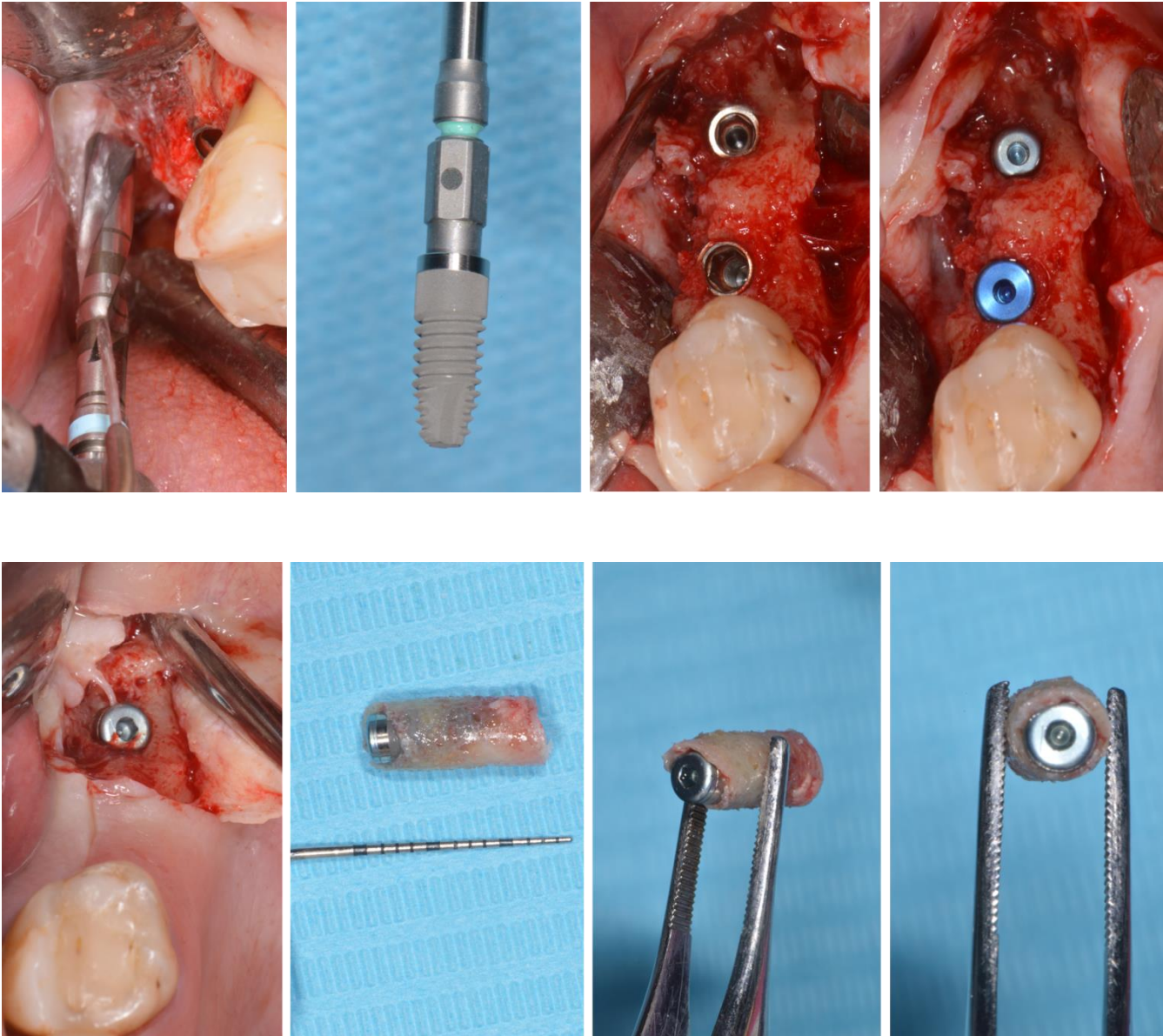
La protesi è stata verificata in occlusione centrica, in protrusione, e in lateralità, al fine di evitare pre-contatti e interferenze occlusali, che avrebbero potuto determinare un sovraccarico dell'osso rigenerato.

La riabilitazione implanto-protetica ha permesso di ripristinare dal punto di vista estetico e funzionale le aree edentule della mandibola posteriore, con una *restitutio ad integrum* delle stesse.

Le immagini seguenti mostrano un caso clinico trattato nel gruppo Test.



Le immagini seguenti mostrano un caso clinico trattato nel gruppo controllo.



3.7 Visite e follow-up

Nella tabella seguente, sono state riportate le visite, previste nel corso dello studio, a cui è stato sottoposto ciascun paziente.

Numero visita	Valutazione
Visita 1	Valutazione pre-operatoria T0
Visita 2	Arruolamento dei pazienti e assegnazione al trattamento
Fase T0	
Visita 3	Valutazione post-operatoria T0
Visita 4	Controllo e valutazione espianto
Fase T1	
Visita 5	Valutazione post-operatoria T1
Visita 6, 7	Controllo mensile
Fase T2	
Visita 10	Protesizzazione

Durante la visita 1, i pazienti sono stati sottoposti alla valutazione pre-operatoria nell'ambito del normale percorso assistenziale per i pazienti che devono essere sottoposti ad interventi di implantologia, che comprende: fotografie intra-orali ed extra-orali; esame obiettivo intra- ed extra-orale; ortopantomografia (OPG); radiografia endorale peri-apicale; eventuali modelli in gesso e ceratura diagnostica; dima diagnostica radiologica-chirurgica; TC Cone Beam. I pazienti che soddisfavano i criteri di inclusione, sono stati sottoposti ad una Visita 2 durante la quale sono stati informati della possibilità di rientrare all'interno di questo protocollo di ricerca. Sono stati informati sugli obiettivi e sulle condizioni dello studio, ed è stato loro richiesto di partecipare allo studio stesso da parte degli sperimentatori. I pazienti hanno ricevuto tutte le informazioni, i chiarimenti, e le spiegazioni facenti parte del consenso informato scritto, che è stato poi firmato dai pazienti per confermare l'effettivo arruolamento nello studio.

E' stata poi eseguita la fase operatoria T0.

Durante la visita 3, i pazienti sono stati sottoposti alla valutazione post-operatoria nell'ambito del normale percorso assistenziale per i pazienti che sono stati sottoposti ad interventi di implantologia, che comprende: fotografie intra-orali; esame obiettivo intra- orale e rimozione suture.

Durante la visita 4 i pazienti sono stati sottoposti ad un controllo clinico, per verificare l'assenza di complicanze biologiche e la possibilità di procedere con l'espianto della fixture aggiuntiva.

E' stata poi eseguita la fase operatoria T1.

Durante la visita 5, i pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione post-operatoria, che comprende: fotografie intra-orali; esame obiettivo intra- orale e rimozione suture.

Durante la visita 6 e 7, i pazienti sono stati sottoposti ad un controllo clinico, per verificare la completa guarigione della mucosa ed a rx periapicale per verificare la salute radiografica degli impianti.

A 3 mesi dall'inserimento degli impianti è stata svolta la fase T2

3.8 Materiali utilizzati e loro fornitura

Le ditte Mectron e Sweden & Martina si sono impegnate a fornire gratuitamente i materiali al fine di permettere il regolare svolgimento dello studio in oggetto. I dispositivi medici che sono oggetto di studio sono dotati tutti di certificati CE e sono già usati nell'ambito del normale percorso assistenziale per i pazienti che sono stati sottoposti a rigenerazione ossea.

3.8.1 Impianti dentali

Gli impianti Premium hanno morfologia prevalentemente cilindrica, con andamento conico solo nel tratto apicale e sono in grado di raggiungere l'osteointegrazione, ovvero il processo biologico attraverso cui è possibile ottenere e mantenere nell'osso una fissazione rigida e clinicamente asintomatica di un materiale alloplastico durante il carico funzionale. Sono caratterizzati da filetto con passo di 1 mm, con profilo conico in direzione apicale e convesso in direzione coronale. Queste caratteristiche aumentano la stabilità primaria ed evitano traumi all'osso dopo il carico. Il disegno delle tacche apicali, l'angolo di taglio e la diminuzione progressiva del diametro del core dell'impianto aumentano la capacità di penetrazione della fixture nell'osso, garantendone una ottima performance in tutte le tipologie di osso. Tale impianto è stato utilizzato nella variante STRAIGHT con profilo di emergenza diritto per le situazioni di spazi coronali ristretti. Il primo tratto, di 0.8 mm, è liscio, per garantire una porzione più difficilmente aggredibile e colonizzabile dai batteri. Il corpo implantare è invece caratterizzato dalla superficie ZirTi, ottenuta per sottrazione attraverso una sabbiatura con ossido di zirconio e mordenzatura con acidi minerali.

3.8.2 Sistema ed inserti piezoelettrici

La preparazione piezoelettrica dei tunnel implantari è stata eseguita con macchina piezoelettrica (Piezosurgery, Mectron Medical Technology, Carasco, Italy) abbinata ad inserti piezoelettrici dedicati (Kit Implant Pro, Piezosurgery, Mectron Medical Technology, Carasco, Italy).

3.9 Variabili valutate

Al fine di raggiungere gli obiettivi primari e secondari dello studio è stato creato un database dove sono state registrate e analizzate le seguenti variabili.

3.9.1 Tipologia ed incidenza di complicanze post-operatorie

La percentuale di complicanze è stata effettuata al momento del carico funzionale, comprendendo tutte le complicanze avvenute in qualunque fase della sperimentazione.

In particolare, sono state considerate come complicanze chirurgiche:

- lesioni vascolari (emorragia venosa, emorragia arteriosa);
- lesioni neurologiche (anestesia, parestesie, disestesia, ipoestesia, iperestesia);
- lesioni mucose (lacerazione o perforazioni delle mucose).

Sono state considerate invece come complicanze biologiche:

- mancata chiusura per 1° intenzione dei lembi chirurgici;
- mancata guarigione dei lembi chirurgici
- Qualunque infezione del sito chirurgico
- mancata osteointegrazione degli impianti, riscontrabile al momento della riapertura.

3.9.2 Valutazione della densità dell'osso

La valutazione della densità dell'osso è stata effettuata intra-operatoriamente secondo la classificazione di Lekholm e Zarb 1985 (Lekholm and Zarb 1985). La qualità del tessuto osseo è stata suddivisa in quattro classi in base al rapporto tra osso corticale e osso spongioso nella sede presa in considerazione.

-I classe (D1): osso compatto formato quasi esclusivamente da osso corticale

-II classe (D2): osso con spessa corticale compatta e densa trabecolatura interna

-III classe (D3): osso con corticale meno spessa e spongiosa meno densa

-IV classe (D4): osso con sottile corticale e trabecolatura rarefatta.

3.9.3 Valutazione della stabilità primaria

La stabilità primaria delle mini-fixture di entrambi i gruppi è stata misurata manualmente mediante chiave dinamometrica da 0 a 100 Ncm e elettronicamente mediante RFA (analisi della frequenza di risonanza) da 10 a 90 ISQ.

3.9.4 Valutazione della rigenerazione ossea

La valutazione dell'osteo-rigenerazione a 28 giorni è stata eseguita in termini qualitativi e quantitativi.

La qualità dell'osso è stata valutata tramite analisi istologica per identificare in ogni campione le varie tipologie di tessuto osso (osso necrotico, osso neoformato e trabecole ossee pre-esistenti). L'analisi istologica è stata eseguita con l'utilizzo di un microscopio ottico.

Inoltre una immagine ad ingrandimento 3X di ogni campione di entrambi i gruppi selezionata casualmente è stata analizzata da due diversi operatori calibrati tra loro utilizzando il software ImageJ 1.33 (National Institute of health, Bethesda, USA) per identificare la proporzione percentuale tra osso necrotico (NBA) e osso vitale (VBA). Per ogni immagine selezionata è stata identificata l'area ossea totale (TBA) e l'area di osso necrotico (NBA). L'area di osso vitale (VBA) è stata ottenuta come differenza tra TBA-NBA.

La valutazione quantitativa dell'osteo-rigenerazione si è basata su tre parametri:

1. quantizzazione per mm^2 del numero di cellule mostranti un'espressione nucleare della proteina SATB2 mediante analisi immunistochemica. Tale proteina è un marcatore specifico e sensibile degli osteoblasti, degli osteociti e delle cellule mesenchimali che si stanno differenziando in senso osteoblastico (Conner et al. 2013)
2. densità vascolare per mm^2 valutando il numero di vasi indipendentemente dal calibro degli stessi utilizzando il marcatore immunistochemico specifico CD31 (Ceruti et al. 2015).
3. presenza di micro-aggregati di infiltrato infiammatorio cronico prevalentemente linfocitario. L'infiltrato infiammatorio è stato definito come assente (assenza di cellule infiammatorie), raro (< 5 elementi per mm^2) presente (almeno 5 elementi per mm^2).

Queste valutazioni sono state effettuate nelle diverse tipologie di tessuto osseo presenti nelle singole biopsie (osso necrotico, osso neoformato e trabecole ossee

pre-esistenti) sia nel gruppo test che nel gruppo controllo al fine di evidenziare eventuali differenze qualitative e quantitative tra i due gruppi in esame, eseguendo una media dei valori per mm².

Per la valutazione dei marcatori immunoistochimici SATB2 e CD31, ogni mini-fixture in entrambi i gruppi è stata espantata insieme ad una quantità di 0,5 mm di tessuto osseo peri-implantare. I prelievi corredati da relativo codice di riferimento numerico sono stati inviati al centro di riferimento (Dr. Alberto Righi, Anatomia Patologica, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italy) per l'analisi istologica ed immunoistochimica.

Le biopsie ossee prelevate sono state fissate per 6-7 ore in formalina tamponata al 4% a temperatura ambiente quindi i campioni sono stati in soluzione decalcificante costituita da 65 ml di acido formico all'85%, 40 ml di acido nitrico al 65% e 895 ml di acqua distillata per 10-12 ore. In seguito sono stati inclusi in paraffina e da ogni incluso sono state ottenute delle sezioni in bianco colorate con ematosillina -eosina per la valutazione istologica e con anticorpo SATB2 (anticorpo policlonale di coniglio, 1:250 diluizione; Sigma, St Louis, MO, USA) e CD31 (anticorpo monoclonale, clone 1A10, Diapath S.p.A. - Martinengo (BG) – Italy) per la valutazione dell' espressione immunoistochimica. Le reazioni immunoistochimiche sono state eseguite in maniera automatizzata utilizzando i programmi specifici per i singoli anticorpi inseriti nell'immunocoloratore Ventana-Menarini (Ventana Medical Systems, Inc. A Member of the Roche Group 1910 Innovation Park Dr. Tucson, AZ 85755 USA)

3.10 Gestione dei dati

Un operatore in cieco ha riportato riportare le informazioni richieste dal protocollo sulla Scheda Raccolta Dati (CRF).

I dati inseriti sono stati successivamente controllati mediante programmi di validazione e controllo di listati. Gli errori ovvi sono stati corretti direttamente dal personale di data management, altri errori od omissioni sono stati invece registrati su moduli di Data Query, inviati agli Sperimentatori per la risoluzione. Il database sarà chiuso una volta dichiarato completo ed accurato.

3.11 Analisi statistica

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare quantitativamente e qualitativamente l'osteogenesi ottenuta dopo preparazione piezo-elettrica del sito implantare (Gruppo Test) versus preparazione convenzionale del sito implantare (Gruppo Controllo)

Le analisi esplorative sono state effettuate utilizzando statistiche descrittive. I dati sono stati presentati sia per la popolazione intent-to-treat (ossia tutti i pazienti che hanno almeno iniziato lo studio) che per la popolazione per-protocol (ossia tutti i pazienti che hanno completato lo studio senza violazioni maggiori del protocollo) che al momento coincidono.

Gli eventuali eventi avversi sono stati riassunti presentando per ogni gruppo di trattamento il numero e la percentuale di pazienti che hanno avuto un qualsiasi evento avverso.

Non essendo disponibili studi precedenti similari a quello proposto, non è stato possibile calcolare il numero di pazienti necessari per avere una potenza statistica dell'80% con livello di significatività del 5% (due code).

I risultati ottenuti nei due gruppi di studio (Gruppo test e Gruppo Controllo) , sono stati sottoposti ad analisi statistica descrittiva ed analisi statistica analitica mediante test specifici, al fine di evidenziare differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

Il test di Kolmogorov-Smirnov test ha evidenziato la distribuzione non normale di

SATBB2 e CD31 pertanto I risultati vengono mostrati come mediana e range interquantile. Dal momento che ogni paziente presentava più di un sito, è stata applicata una analisi multivariata che tenesse in considerazione il sito, la zona e la densità ossea. La significatività statistica è stata fissata a $\alpha = 0.05$.

Capitolo 4

RISULTATI

4. RISULTATI

4.1 Popolazione intent-to-treat

Lo studio ha compreso un totale di 12 siti corrispondenti a 5 pazienti che soddisfassero tutti i criteri di inclusione e di esclusione prestabiliti. Quattro pazienti presentavano due siti edentuli ed hanno ricevuto contemporaneamente un impianto del Gruppo test ed uno del Gruppo controllo. Un paziente presentava 4 siti edentuli e ha ricevuto 2 siti test e due siti controllo, permettendo di svolgere uno studio splith-mouth.

I pazienti trattati comprendevano 4 femmine e 1 maschio, con una età media di 53 ± 8 anni. Tutti i pazienti sono stati classificati sulla base della valutazione anamnestica in ASA I ($n=5$; 100.0%). I pazienti sono stati classificati sulla base dell'abitudine al fumo in fumatori ($n=1$, 20%) e in non fumatori ($n=4$, 80.0%).

4.2 Popolazione per-protocol

Tutti i 12 siti sono stati trattati in fase T0, comprendente l'inserimento degli impianti, l'inserimento delle mini-fixture.

Tutti i 12 siti sono stati trattati in fase T1, comprendente l'espianto delle mini fixture a 28 giorni. Attualmente tutti i 12 siti sono in fase T2. Durante le fasi di studio non si sono verificati drop-out.

Di conseguenza, sono stati considerati 12 siti (6 nel gruppo A e 6 nel gruppo B) per la valutazione delle variabili misurate in fase T0 e T1.

4.3 Impianti

In totale, sono stati inseriti 23 impianti (Premium, Sweden & Martina) con diametro implantare di 3,8, 4,25 e 5 mm e lunghezza implantare che variava da 8,5 mm a 11,5, a seconda del decorso del nervo alveolare inferiore. Contestualmente sono state inserite 12 mini- fixture con dimensioni 3.3 X 8.5 (Premium, Sweden & Martina).

4.4 Complicanze chirurgiche, densità ossea e stabilità primaria

Non si sono registrate complicanze chirurgiche intra o post-operatorie sia nel gruppo test che nel gruppo controllo. La chirurgia di espianto non ha determinato nessuna complicanza intra chirurgica o post-chirurgica in nessuno dei due gruppi.

6 impianti sono stati inseriti in osso di tipo D1 (corticale spessa, senza midollare), 2 di tipo D2 (corticale spessa, con midollare) e 2 in osso di tipo D4 (corticale assente, midollare spessa) (Leckholm & Zarb 1985).

In fase T0, tutti gli impianti (n= 12, 100.0%) hanno mostrato una stabilità primaria sufficiente per essere posizionati a livello della cresta alveolare.

Nell Gruppo test il valore medio di IT era 80.0 ± 10.0 Ncm, mentre il valore medio di RFA era 87.0 ± 5.0 ISQ. Nel gruppo Controllo il valore medio di IT era 79.0 ± 10.0 Ncm, mentre il valore medio di RFA era 84.5 ± 6.0 ISQ. Non ci sono differenze significative tra gruppo test e gruppo controllo ($P > 0.05$).

4.5 Valutazione qualitativa della rigenerazione ossea

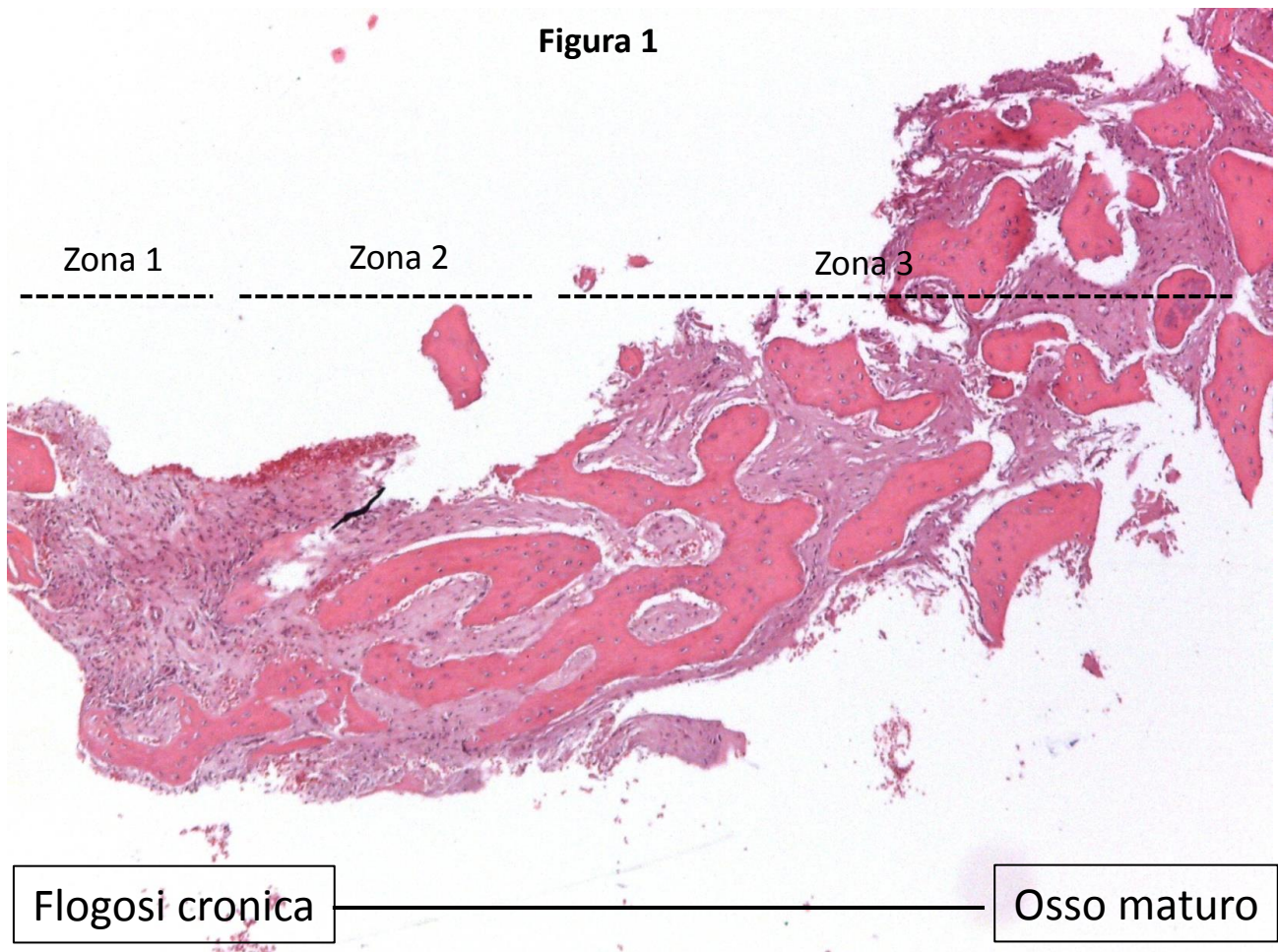
Tutti i campioni sia del Gruppo Test che del Gruppo Controllo mostrano un quadro istologico sovrapponibile. In ogni campione di ciascun gruppo si osserva la presenza di osso trabecolare residuo in vari stadi di necrobiosi associato ad aspetti di osteo- rigenerazione in diverse fasi che portano alla formazione di osso trabecolare maturo passando per la produzione di matrice osteoide da parte delle cellule mesenchimali fuse e conseguentemente per la produzione di osso immaturo cosiddetto "woven-bone".

L'osso necrotico è caratterizzato dall'assenza di osteociti vitali associato alla mancanza del rimming di osteoblasti alla periferia delle singole trabecole.

Le trabecole necrotiche sono circondate da un infiltrato infiammatorio cronico prevalentemente linfocitario associato a un incremento della componente vascolare e alla presenza di cellule fuse mesenchimali, che mostrano l'espressione nucleare della proteina SATB2, che si stanno pertanto differenziando in senso osteogenico. La componente vascolare risulta essere più numerosa e costituita da elementi di piccolo calibro in prossimità delle aree di osso necrotico e, al contrario, risulta essere meno numerosa ma con un aumento del diametro del lume vascolare nelle aree di tessuto osseo trabecolare maturo. L'analisi morfometrica tramite software ImageJ ha rilevato per il Gruppo Test una percentuale di osso necrotico di 10,3% e per il gruppo Controllo 10,6%. Non sono state identificate differenze significative tra i due gruppi.

4.5.1 Valutazioni istologiche Gruppo test (Sistematica Piezoelettrica)

La figura seguente (Figura 1) rappresenta la visione panoramina della sezione istologica colorata con ematossilina-eosina del paziente 2 appartenente al Gruppo A ovvero quello trattato con tecnica piezoelettrica.

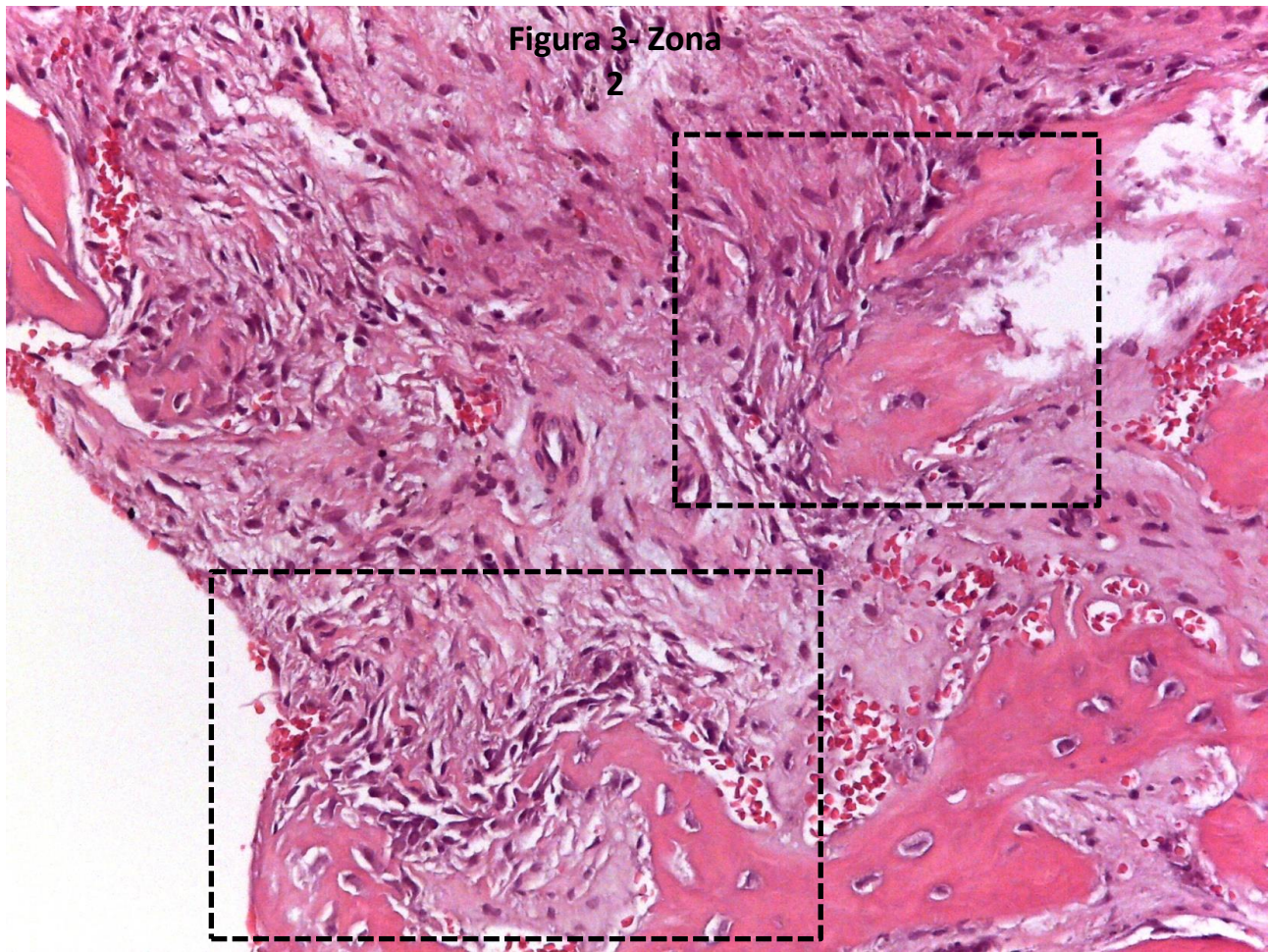


La Figura 1 è una sezione colorata con ematossilina-eosina che mostra una panoramica del preparato dove si possono identificare le varie fasi del processo di osteo-integrazione implantare: dalle aree di necrosi associata all'infiltrato flogistico cronico e alla neo-vascolarizzazione fino alla formazione di trabecole ossee mature.

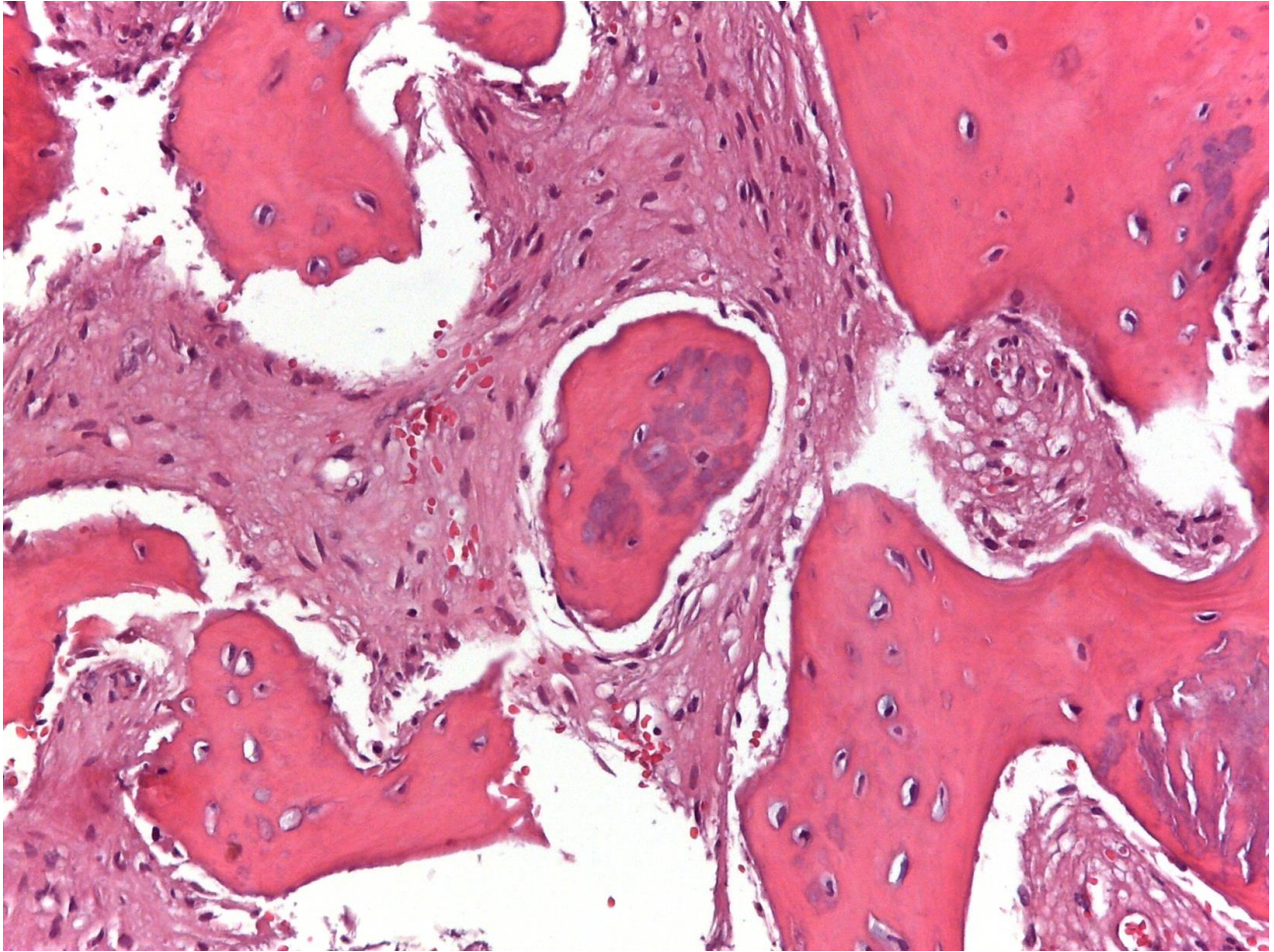
Figura 2- Zona 1



La Figura 2 mostra a più alto ingrandimento una trabecola ossea necrotica priva di osteociti e di rimming osteoblastico associato ad un minimo infiltrato flogistico cronico linfocitario e ad un'elevata neo-vascularizzazione.



La figura 3 mostra a più alto ingrandimento un'area di elevata osteo-
rigenerazione (zona 2), presentante una proliferazione a cellule fusate associate
alla formazione di matrice osteoide e di osso immaturo.

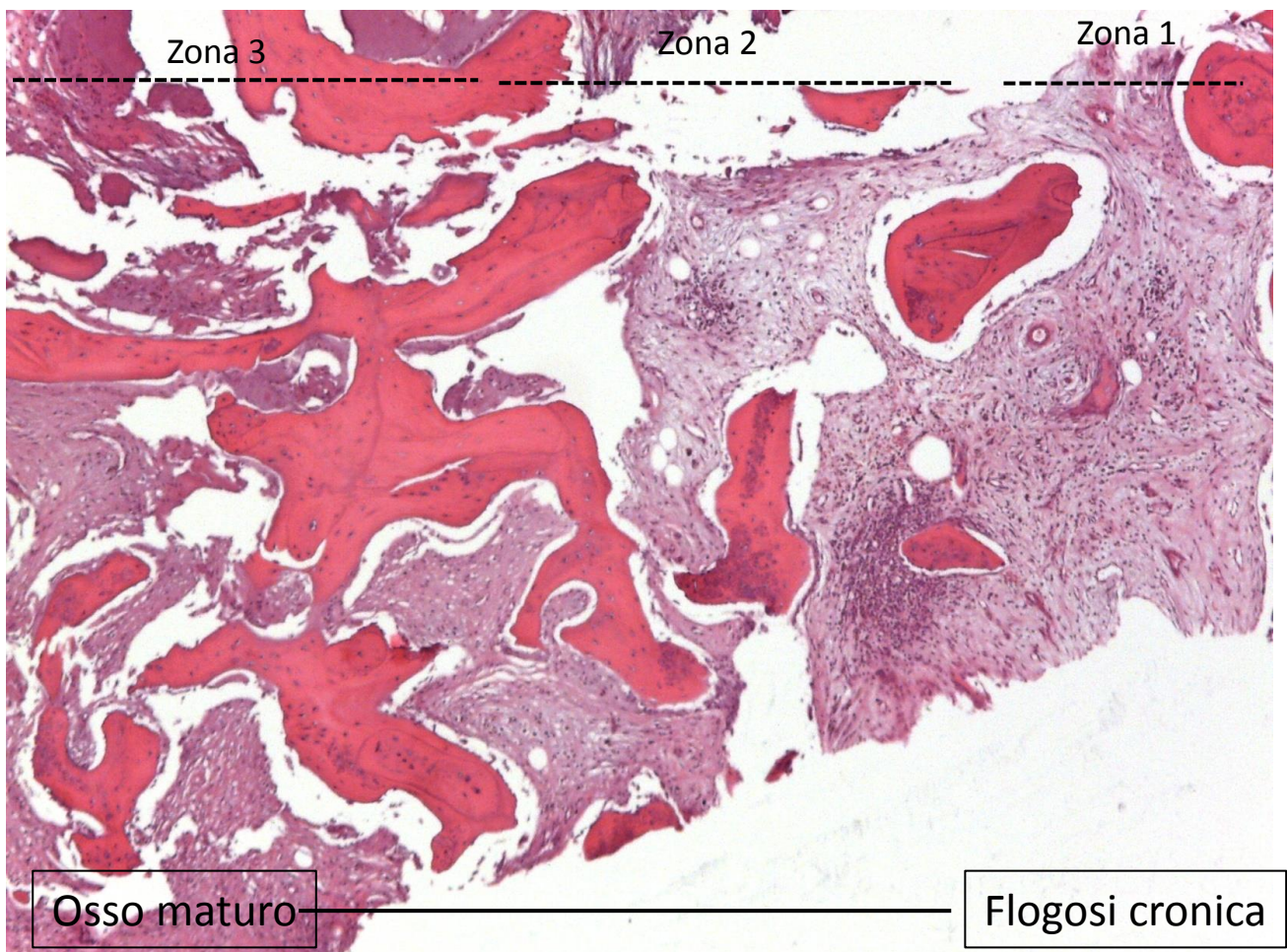


La figura 4 mostra un'area di tessuto osseo trabecolare maturo vitale (Zona 3) con un'attività osteo-rigenerativa inferiore alla zona 2 suffragata dalla minor quantità di cellule fusate associate ad un incremento di densità del tessuto osseo.

4.5.2 Valutazioni istologiche Gruppo Controllo (Sistematica Convenzionale)

La figura seguente (Figura 5) è una sezione colorata con ematossilina-eosina che mostra una panoramica del preparato relativo al medesimo paziente (numero 2) nel sito trattato nel gruppo controllo ovvero quello trattato con tecnica convenzionale, dove si possono identificare le medesime fasi del processo di osteo-integrazione implantare: dalle aree di necrosi associata all'infiltrato flogistico cronico e alla neo-vascolarizzazione fino alla formazione di trabecole ossee mature.

Figura 5



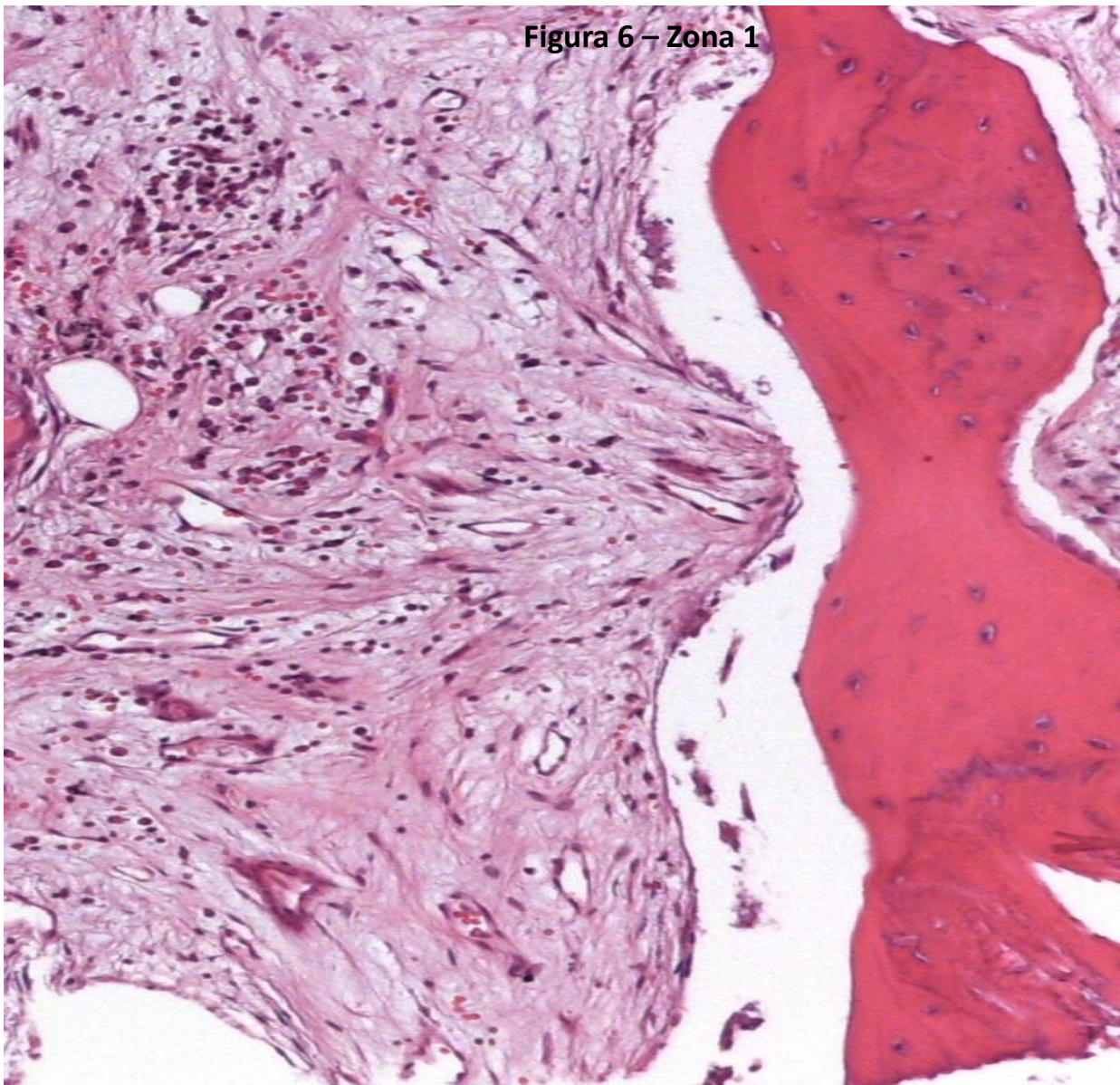


Figura 6 – Zona 1

La Figura 6 mostra a più alto ingrandimento una trabecola ossea in iniziale stato necrobiotico priva di rimming osteoblastico e con occasionali osteociti vitali associato ad un marcato infiltrato flogistico cronico linfocitario e ad un'elevata neo-vascularizzazione.

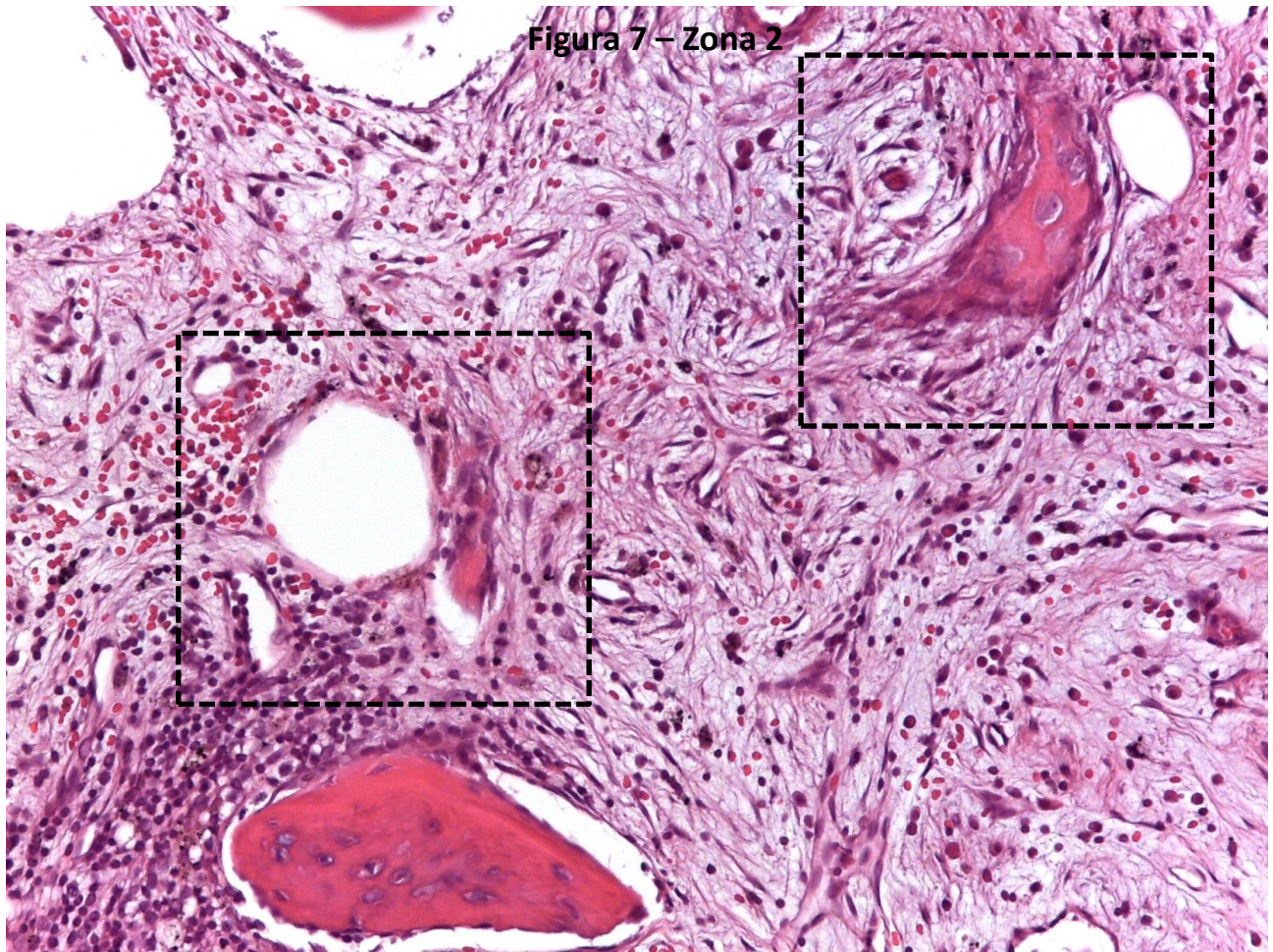
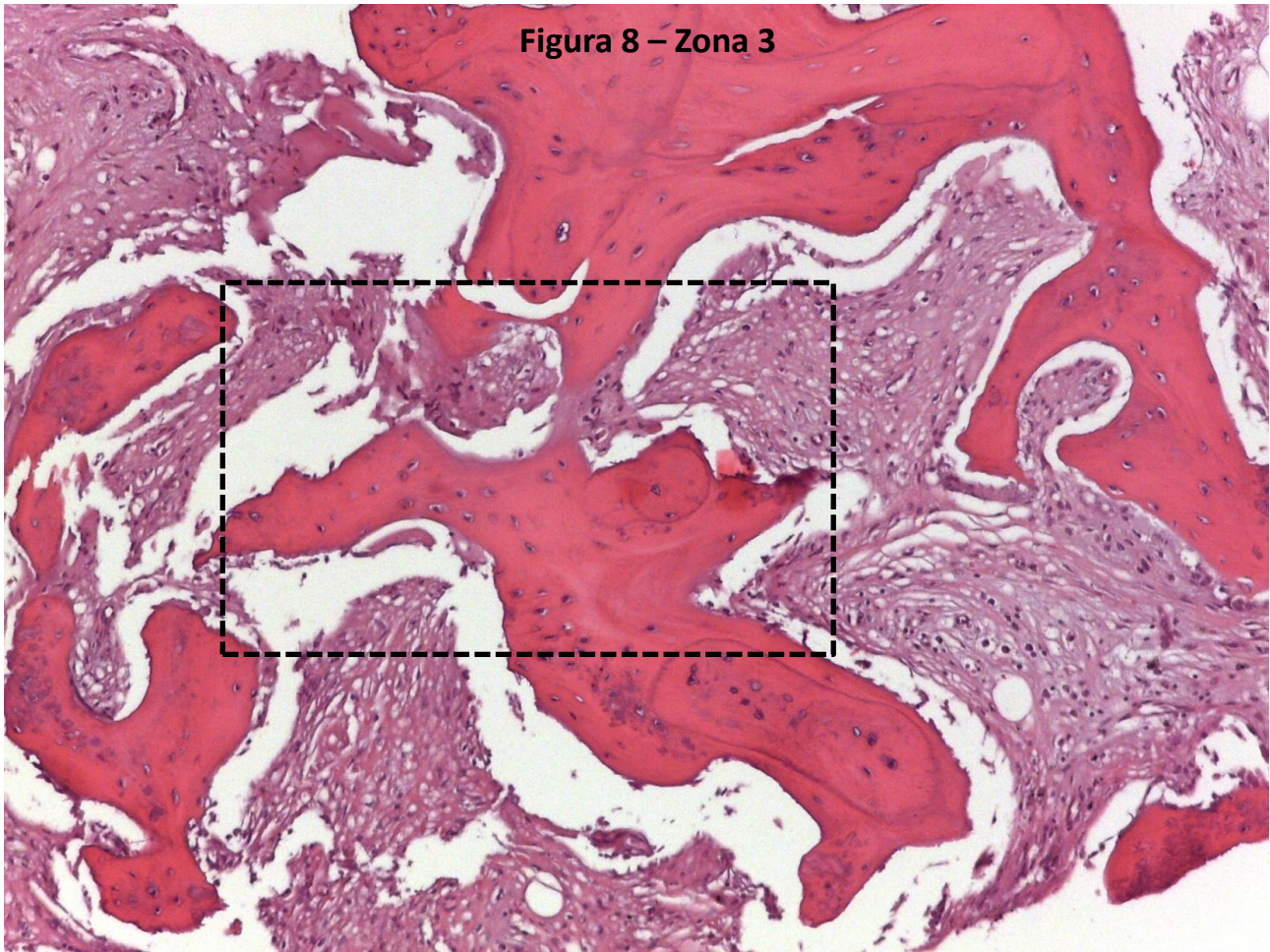


Figura 7 – Zona 2

La figura 7 mostra a più alto ingrandimento un'area di iniziale osteo-rigenerazione (zona 2) con proliferazione di cellule fusate associate ad un minimo infiltrato flogistico cronico accanto all'area di rimaneggiamento descritta in precedenza. E' presente spiccata attività osteoblastica, rimming osteoblastico e componente vascolare.



La figura 8 mostra un'area di tessuto osseo trabecolare maturo vitale (Zona 3) con una marcata attività osteo-rigenerativa evidenziata dalla presenza di una matrice osteoide immatura che si sta depositando tra due trabecole ossee pre-esistenti.

4.6 Valutazione quantitativa della rigenerazione ossea

Tutti i campioni sia del Gruppo Test che del Gruppo Controllo mostrano un quadro immunoistochimico sovrapponibile. In ogni campione di ciascun gruppo si osserva la presenza di cellule mesenchimali fusate sensibili al marcatore SATB-2 e quindi in differenziamento in senso osteoblastico. Inoltre, In ogni campione di ciascun gruppo si osserva la presenza vasi sanguigni positivi al marcatore immunoistochimico specifico CD31.

Nel gruppo test la mediana suddivisa per zone di cellule positive al marcatore SATB2 è stata di 24.85 (range interquartile: 22.62), 117.55 (range interquartile: 81.38) e 84.85 (range interquartile: 73.65) numero di cellule /mm² per la zona 1, 2 ,3 rispettivamente. La mediana totale Invece è stata di 61.90 numero di cellule /mm² (range interquartile: 88.32).

Nel gruppo test la mediana suddivisa per zone di cellule positive al marcatore CD31 è di 23.90 (range interquartile: 9.5) 12.15 (range interquartile: 3.60) e 6.65 (range interquartile: 2.70) numero di vasi/mm² per la zona 1, 2 ,3 rispettivamente. La mediana totale Invece è stata di 12.15 numero di vasi /mm² (range interquartile: 12.85).

Nel gruppo controllo, la mediana suddivisa per zone di cellule positive al marcatore SATB2 è stata di 24.05 (range interquartile: 21.75), 113.35 (range interquartile: 87.509) e 82.55 (range interquartile: 75.48) per la zona 1, 2 ,3 rispettivamente. La mediana totale Invece è stata di 59.40 (range interquartile: 13.68).

Nel gruppo controllo, la mediana suddivisa per zone di cellule positive al marcatore CD31 è stata di 23.30 (range interquartile: 13.68), 11.85 (range interquartile: 3.50,) e 6.20 (range interquartile: 3.15) per la zona 1, 2 ,3 rispettivamente. La mediana totale Invece è stata di 11.85 (range interquartile: 90.7).

L'infiltrato flogistico riscontrato è stato di tipo cronico per entrambi i gruppi. Nel gruppo test l'infiltrato cronico è stato catalogato come presente in zona 1, raro in zona 2 ed assente in zona 3. Nel gruppo controllo l'infiltrato cronico è stato catalogato come presente in zona 1, raro in zona 2 ed assente in zona 3.

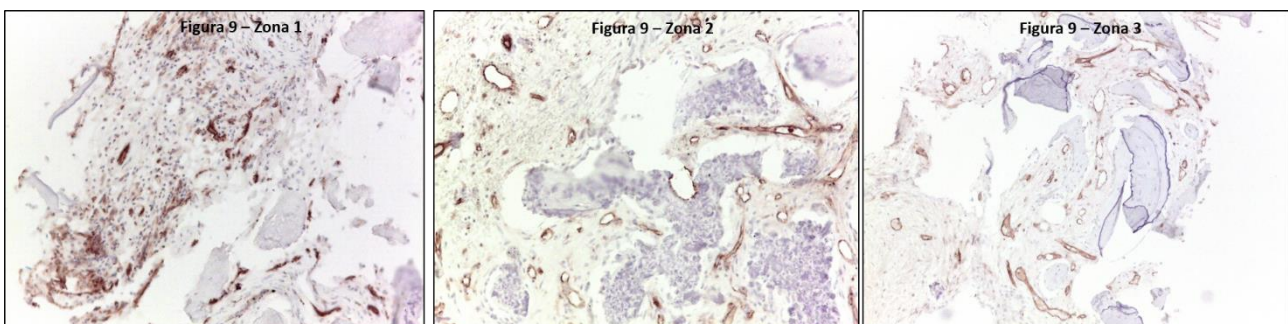
Per quanto riguarda la positività al marcatore SATBB-2 non è stata riscontrata una differenza significativa tra i due gruppi ($p= 0.95$), ma tra le zone 1 (64 cellule /mm² in meno) e 2 (26 cellule /mm² in più) di ogni sito rispetto alla zona 3.

Per quanto riguarda la positività al marcatore CD31, Non è stata riscontrata una differenza significativa tra i due gruppi ($p= 0.84$), ma tra le zone 1 (19 vasi /mm² in più) e 2 (6 vasi /mm² in più) di ogni sito rispetto alla zona 3 per CD31.

La densità ossea non risulta influenzare eventuali differenze significative tra i due gruppi in merito a SATB2 o CD31 ($p=1$).

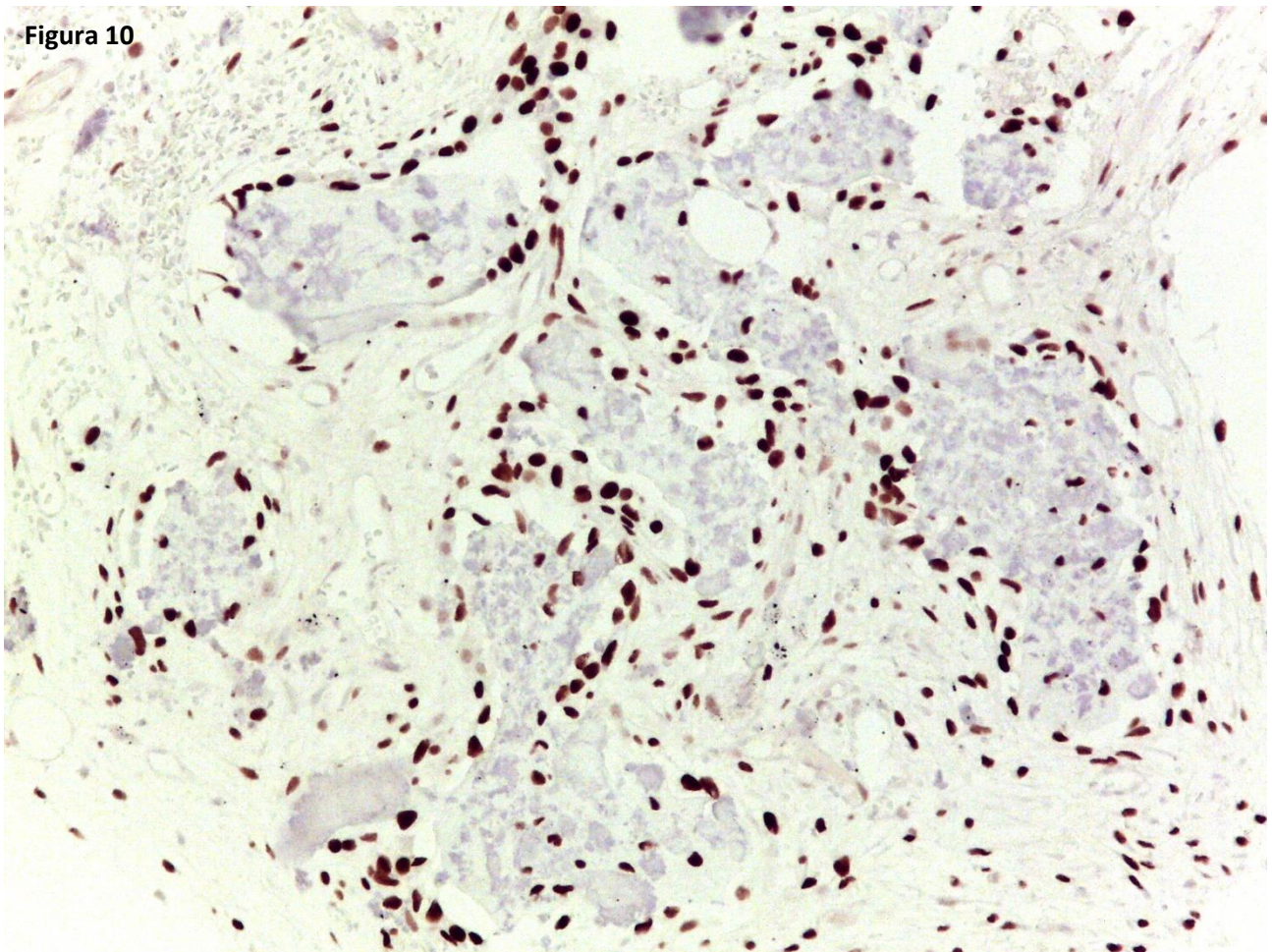
La densità di classe 2 provoca una diminuzione di 66 cellule /mm² rispetto alla classe 4 ($p=0.017$); non si osservano relazioni significative tra numero di vasi e densità ossea.

La Figura 9A, B, C mostra l'espressione della densità nonché del calibro vascolare utilizzando il marcatore immunohistochimico specifico CD31.



Nelle aree di necrosi associate agli aspetti di rimaneggiamento sono evidenti numerosi vasi di piccolo calibro (ZONA 1) che diminuiscono di quantità aumentando di diametro nelle aree di formazione di osso immaturo (ZONA 2) e nelle aree con maggiore densità ossea costituite da trabecole ossee mature (ZONA 3).

La figura 10 mostra l'aspetto delle cellule mesenchimali positive al marcatore SATB-2 e quindi in differenziamento in senso osteoblastico



Esempio dell'elevata espressione immunoistochimica nucleare della proteina SATB2 nelle aree di osterigenazione dove mette in evidenza sia le cellule mesenchimali fusate che si stanno differenziando in senso osteogenico, sia gli osteociti che gli osteoblasti.

Capitolo 5

DISCUSSIONE

5. DISCUSSIONE

L'implantologia osteointegrata è, oggi, un'opzione terapeutica largamente usata per la riabilitazione di edentulie singole, parziali o totali con alte percentuali di successo sia da un punto di vista funzionale che estetico (Leonhardt ET AL. 2002, Karoussis ET AL. 2004, Kazor et al. 2004, Garber et al. 1995).

Seppur ben documentata in letteratura, questa tecnica può presentare dei rischi quali la possibilità di danneggiare tessuti molli, strutture anatomiche nobili e la possibilità di generare una necrosi ossea a causa del surriscaldamento osseo intraoperatorio (Siervo et al. 2004, Sanmartino et al. 2011).

La chirurgia piezoelettrica è una promettente tecnica per il taglio dei tessuti duri che pare essere in grado di superare i limiti della strumentazione tradizionale nel campo della chirurgia ossea (Pereira et al. 2004; Vercellotti et al. 2004, 2014).

Il dispositivo piezoelettrico è una macchina ad ultrasuoni che utilizza una frequenza di 25-30 kHz. A questa frequenza è in grado di tagliare unicamente i tessuti mineralizzati risparmiando i tessuti molli che necessitano invece una frequenza superiore ai 50 kHz. Quando usato correttamente, il dispositivo piezoelettrico non è in grado di incidere la membrana schneideriana del seno mascellare, né strutture vascolo-nervose o periostee e può quindi essere utilizzato durante le chirurgie che prevedono l'avvicinamento a tali strutture nobili (Schlee et al. 2006).

In aggiunta altri vantaggi della chirurgia piezoelettrica sono la miglior visibilità intraoperatoria ed il taglio netto e preciso. Il motivo del primo vantaggio risiede nel cosiddetto effetto cavitazione, cioè la capacità dello strumento di creare uno spray di aria-acqua che deterge l'alveolo (Schlee et al. 2006).

Il motivo del secondo vantaggio risiede nella minor vibrazione della punta dello strumento e nella minor pressione richiesta all'operatore durante le fasi di taglio che comporta anche un notevole aumento della sensibilità manuale intraoperatoria (Schlee et al. 2006).

In ragione di queste caratteristiche, la chirurgia piezoelettrica è stata applicata negli ultimi anni in molti campi della chirurgia maxillo-facciale ed orale come la chirurgia dei terzi molari (Monaco et al. 2014), la chirurgia ortognatica (Ueki et al. 2004) la chirurgia pre-protetica (Vercellotti et al. 2000, 2001; Sohn et al. 2007; Wallace et al. 2007, Happe et al. 2007, Danza et al. 2009, Bovi et al. 2010).

Ultimamente la piezochirurgia è stata impiegata anche in ambito implantare.

Sono infatti ad oggi disponibili inserti che permettono la preparazione ultrasonica del tunnel implantare superando quindi la convenzionale metodica che prevedeva l'utilizzo di una sistemica a fresa (Vercellotti et al. 2014; Cucchi et al. 2017).

L'applicazione della chirurgia piezoelettrica in campo implantare permette di sfruttare tutti i vantaggi già elencati, diminuendo in maniera significativa il rischio di danno iatrogeno a strutture nobili (Wallace et al. 2007 Schaeren et al. 2008), riducendo la necessità di ricorrere a chirurgie pre-protetiche e velocizzando la riabilitazione di edentule totali o parziali (Stacchi et al. 2013).

Studi recenti hanno ipotizzato, oltre i vantaggi già elencati, la capacità della piezochirurgia di modificare le fasi iniziali del processo di guarigione ossea osteotomica e dell'osteo-integrazione (Preti et al. 2007) anche se i dati presenti in letteratura sono discordanti (Esteves et al. 2013, Vercellotti et al. 2005).

Il processo di guarigione ossea osteotomica in seguito a chirurgia piezoelettrica è stato indagato da un punto di vista istologico ed immunoistochimico unicamente con studi su animali (Esteves et al. 2013, Ma et al. 2013, Vercellotti et al. 2005).

Esteves e colleghi nel 2013 (Esteves et al. 2013) hanno realizzato uno studio su animale che si poneva l'obiettivo di comparare la guarigione di difetti ossei subcritici realizzati con piezochirurgia o strumentazione rotante. 110 ratti sono stati trattati con piezochirurgia o strumentazione rotante e sono stati sottoposti ad analisi istologica, istomorfometrica, immunoistochimica o biomolecolari a diversi intervalli di tempo come 3,7,14,30,60 giorni.

È stato selezionato un difetto subcritico secondo la definizione di Hollinger 1990 (Hollinger et al. 1990) in modo che venissero eliminati eventuali bias dovuti alle caratteristiche del difetto osseo.

Tutti i difetti ossei subcritici in entrambi i gruppi sono guariti con piena rigenerazione del tessuto osseo. Le caratteristiche istologiche e istomorfometriche delle fasi di guarigione erano molto simili tra i gruppi fatta eccezione della valutazione 30 giorni. A 30 giorni infatti la quantità di osso era significativamente più alta nel gruppo trattato con chirurgia piezoelettrica ($p < 0.05$, $73.88\% \pm 12,08$ vs $57,81\% \pm 12,00$). Tuttavia, questa differenza è scomparsa a 60 giorni dopo l'intervento dove non c'erano differenze in termini di quantità e qualità tra i due gruppi in termini di osso.

Tra i gruppi non si è evidenziata nessuna differenza immunoistochimica con uguale concentrazione dei marcatori osteoblastici ed endoteliali così come l'espressione genica della BMP.

Questi risultati potrebbero essere indicativi di una migliore guarigione ossea in seguito a chirurgia piezoelettrica a 30 giorni. Tuttavia, le analisi immunoistochimiche successive indicano che questa maggiore formazione ossea non è dovuta ad una reale accelerazione durante le prime fasi di guarigione. Infatti, l'analisi immunoistochimica non ha evidenziato differenze statisticamente significative in termini di espressione di VEGF e CAS-3 o di espressione genica.

Gli autori hanno concluso che la chirurgia piezoelettrica non comporta modifiche istologiche ed istomorfometriche durante le prime fasi della guarigione in contrasto con Vercellotti et al. 2005 e Ma et al. 2013 che invece hanno rilevato una guarigione ossea migliore (Ma et al. 2013, Vercellotti et al. 2005).

E' importante però sottolineare che lo studio di Ma et al. 2013 (Ma et al. 2013) analizza difetti ossei di entità minore così come lo studio di Vercellotti et al. 2005 (Vercellotti et al. 2005) valuta la guarigione in seguito a chirurgia parodontale.

Ma e colleghi hanno realizzato uno studio su animale nel quale comparavano la guarigione di osteotomie realizzate con la piezochirurgia o con 2 diverse sistematiche rotanti. Il gruppo trattato con chirurgia piezoelettrica ha rilevato all'analisi istologica una tendenza ad una maggiore formazione ossea e rimodellamento tra le due e le tre settimane osseo rispetto al gruppo di animali trattati con chirurgia convenzionale. Tuttavia non è riportata una analisi statistica dettagliata (Ma et al. 2013).

Il processo di osteointegrazione in seguito a preparazione piezoelettrica del sito implantare da un punto di vista isologico o immunoistochimico è stato invece indagato in misura minore e sempre su modelli animali.

Preti et al. (Preti et al. 2007) hanno messo in luce che il sito implantare preparato con metodica a frese sviluppa una fase infiammatoria maggiore e più lunga rispetto al sito preparato con metodica piezoelettrica. Gli autori hanno infatti confrontato carote ossee prelevate in maniera stadiata da siti implantari preparati con metodica piezoelettrica e convenzionale dimostrando come nei prelievi derivanti da siti piezoelettrici la quota infiammatoria fosse statisticamente minore. Inoltre era maggiore la rigenerazione ossea a 7,14 e 30 giorni con un maggior numero di osteoblasti e vasi per campo ad alto ingrandimento. Tali differenze scomparivano a 60 giorni dal posizionamento del sito implantare confermando l'ipotesi che l'osteointegrazione in seguito a preparazione piezoelettrica del sito implantare fosse più veloce rispetto alla tecnica convenzionale.

In aggiunta i siti trattati in maniera piezoelettrica mostravano un calo più veloce delle citochine pro-infiammatorie quali TNF-A e una maggiore quota di quelle antinfiammatorie come IL-10. Contestualmente nei prelievi del gruppo trattato con chirurgia piezoelettrica si osservava anche un più rapido incremento di proteine BMP-4 e fattore TGF-B a 7 e 14 giorni markers legati alla formazione e al rimodellamento osseo indici di un più rapido passaggio alla fase di neoformazione ossea. Tali risultati portavano gli autori a concludere che il processo di osteointegrazione poteva essere velocizzato con la metodica piezoelettrica rispetto alla tecnica convenzionale.

Un'assenza di differenza nel contatto tra osso neoformato ed impianto (BIC) tra i campioni trattati con le due diverse tecniche è invece stata messa in luce da Bengazi e colleghi (Bengazi et al. 2012). Gli autori hanno descritto l'assenza di differenze significative tra le due metodiche in termini di contatto osso-impianto. Entrando nel merito dei risultati gli autori evidenziano addirittura una lieve superiorità della sistematica convenzionale senza però ottenere una significatività

statistica. Assenza di differenze significative è stata confermata l'anno seguente da Kfoury e co-autori (Kfoury et al. 2013).

Molto recente sull'argomento è lo studio di Sirolli et al. del 2016. Tramite modello animale, gli autori hanno valutato l'effetto di piezosurgery sulla formazione ossea attorno agli impianti di titanio rispetto alla tecnica di preparazione convenzionale. Inoltre, è stata anche valutata l'influenza della regione di osso (corticale vs. midollare) su entrambe le tecniche. L'analisi istologica ha dimostrato che in seguito entrambe le tecniche si è verificata neoformazione ossea intorno agli impianti inseriti. Tuttavia, l'efficacia delle due tecniche è risultata essere influenzata dalla densità dell'osso. La tecnica piezoelettrica ha mostrato una rigenerazione ossea statisticamente maggiore in osso spongioso. In osso corticale, la tecnica convenzionale ha invece ottenuto risultati significativamente migliori. Entro i limiti del presente studio, gli autori concludono che la tecnica piezoelettrica può effettivamente migliorare in trattamento di zone ossee midollari (Sirolli et al. 2016).

Ad oggi, il progetto esposto è attualmente l'unico lavoro in letteratura che confronta da un punto di vista istologico e immunoistochimico il processo di osteo-integrazione dopo preparazione del sito implantare con tecnica piezoelettrica o convenzionale su modello umano.

Quando inserito con tecnica convenzionale, l'impianto viene immediatamente circondato da un coagulo ematico che ha la capacità di rilasciare fattori che influenzano le cellule mesenchimali e infiammatorie. Nei giorni seguenti si verifica la migrazione di neutrofili prima e macrofagi poi nel sito chirurgico. La porzione di osso traumatizzato viene rimossa dagli osteoclasti. Dopo circa 1 settimana dall'impianto i macrofagi iniziano a liberare fattori di crescita in grado di richiamare cellule mesenchimali che sono in grado di rilasciare matrice extracellulare (fibroplasia) e la formazione di nuovi vasi (angiogenesi). Attraverso questi due processi si stabilisce la formazione di un tessuto connettivo provvisorio. Il passaggio da tessuto connettivo a tessuto osseo si verifica lungo le strutture

vascolari. Tra le 3 e le 4 settimane, le cellule mesenchimali multipotenti osteoprogenitrici tipo i periciti si dispongono in prossimità dei vasi differenziandosi in senso osteogenico producendo dapprima una matrice osteoide che tra le 3 e le 4 settimane post-intervento gradualmente diventerà osso neoformato immaturo il cosiddetto "woven bone" che poi maturerà dando origine alle trabecole ossee mature. della matrice osteoide immatura, il cosiddetto "Woven Bone". Questo osso è caratterizzato da: rapida deposizione lungo i vasi, matrice collegene poco organizzata, grande numero di osteoblasti intrappolati, bassa resistenza al carico. stimolare la formazione di un tessuto connettivo provvisorio indifferenziato ricco di vasi di nuova formazione, fibroblasti, cellule mesenchimali indifferenziate. Le cellule mesenchimali differenziano poi in osteoblasti che depositeranno matrice organica osteoide. Questo tessuto tra le 3 e L'analisi istologica dei nostri campioni a 30 giorni ha messo in luce come in entrambe le metodiche la fase di guarigione sia la medesima. Vi è infatti la presenza di uno stroma connettivale ricco di precursori osteoblastici, vasi e matrice extracellulare che porta alla formazione di tessuto osseo immaturo, il cosiddetto "woven-bone".

La rigenerazione ossea intorno all'impianto è stata inoltre valutata indagando le caratteristiche del tessuto perimplantare tramite marcatore osteogenetici e angiogenetici.

I risultati del presente studio indicano che non ci sono differenze tra i due gruppi di studio sia da un punto di vista morfologico che immunohistochimico. Entrambi i gruppi mostrano un'osteo-rigenerazione senza particolari differenze in termini di quantità di cellule che si stanno differenziando in senso osteoblastico e sia in termini di densità vascolare. Il presente studio supporta quindi i precedenti lavori scientifici che non identificavano marcate differenze tra le due tecniche nonostante siano stati usati marcatori differenti rispetto a precedenti lavori scientifici. Rispetto agli studi precedenti sono stati utilizzati marcatori quali il SATB-2 e il CD31 che hanno permesso di valutare l'attività ossea concentrandosi su una valutazione su mm² di tessuto stromale peri-implantare. Per la prima volta in ambito implantare si è valutata la positività al SATB2 (Special AT-rich sequence-binding protein 2). Questa è una proteina nucleare che svolge un ruolo

fondamentale nel differenziamento delle cellule mesenchimali multipotenti in senso osteogenico (Conner et al. 2013, Zhang J et al. 2011). La proteina SATB2 si è dimostrato come il marcatore osteogenico più sensibile e specifico disponibile attualmente in commercio, con il fondamentale vantaggio di poter eseguire la reazione immunohistochimica in maniera automatizzata, eliminando, pertanto, le cross-reazioni spesso rilevate utilizzando manualmente altri marcatori di linea osteogenica, che rendono molto soggettiva e poco riproducibile la valutazione degli stessi (Conner et al. 2013).

L'assenza di differenze indica che la rigenerazione ossea di entrambe le tecniche segue le medesime fasi e tempistiche biologiche.

Inoltre in tutti i campioni vi è la presenza di cellule vitali che si stanno differenziando in senso osteogenico fugando i dubbi sulla influenza della temperatura elevata in seguito a preparazione del sito implantare con tecnica piezoelettrica. La creazione di alte temperature durante la preparazione del letto implantare è in grado di compromettere l'ottimale guarigione ed integrazione dell'impianto. L'innalzamento intra-operatorio della temperatura può essere determinato da diversi fattori quali: le variazioni di spessore corticale (Eriksson et al. 1984), l'uso degli inserti da preparazione (Lavelle e Wedgwood 1980), la profondità di preparazione, (Wiggins & Malkin 1976; Ercoli et al., 2004; Sener et al. 2009), la velocità di preparazione (Costich et al. 1964), e la pressione applicata (Matthews E Hirsch 1972). La temperatura critica in grado di generare necrosi ossea è stata identificata intorno ai 47 gradi centigradi (Eriksson & Alberksson 1983). L'analisi istologica dei campioni del presente studio ha messo in luce come entrambe le modalità di preparazione del letto implantare sono state in grado di soddisfare i requisiti biologici che stanno alla base di una corretta guarigione ossea.

Nel presente studio, l'assenza di differenze significative non pare essere dovuta a bias nella selezione dei campioni dal momento che lo studio è stato realizzato secondo un modello splith mouth. Può essere tuttavia dovuto al ridotto numero di casi derivanti dalla impossibilità di determinare una dimensione campionaria esatta. Gli studi esistenti su modello animale e l'assenza di studi su modello umano, sebbene la pratica sia già in atto, non permettono di avere valori di riferimento in

merito alla numero di casi da trattare con entrambe le tecniche. Tali studi non risultano pertanto utili a definire la dimensione campionaria necessaria per disegnare uno studio clinico randomizzato che si ponga l'obiettivo di evidenziare eventuali differenze statistiche significative tra le due tecniche in termini di osteointegrazione. E' stata quindi impostata una valutazione pilota di 12 casi.

Inoltre, la possibilità della chirurgia piezoelettrica di interagire con le prime fasi biologiche della guarigione era stata ipotizzata anche sulla base delle caratteristiche microscopiche della linea osteotomica. Maurer et al. nel 2008 in seguito alla valutazione microscopica di osso trattato con frese o con piezochirurgia, ha messo in luce come la metodica piezoelettrica comporti la creazione di un osso con spazi midollari pervi e ben conservati. Ciò poteva ridurre la durata dell'azione macrofagica velocizzando la migrazione di osteoblasti e la conseguente fase di osteogenesi. Questo più rapido passaggio dalla fase di necrosi ossea a quella di neoapposizione in seguito a preparazione piezoelettrica del sito sembrava trovare conferma in una minor diminuzione della stabilità primaria ed un più veloce passaggio dalla stabilità primaria a quella secondaria (Stacchi et al. 2013; Canullo et al. 2013).

Oltre la dimensione campionaria ridotta, altri fattori che potrebbero avere influito sui risultati annullando i vantaggi correlati alle caratteristiche dell'osteotomia potrebbero essere: il movimento dell'inserito che se fatto in maniera non corretta potrebbe influenzare la detersione dei detriti, la sequenza operativa usata e la forza impiegata che potrebbe ridurre la vibrazione dell'inserito oppure l'allungamento dei tempi intraoperatori che potrebbe causare sofferenza ossea.

Le due tecniche di preparazione del sito implantare sono inoltre state confrontate da per quanto riguarda le complicanze intra-operatorie e post-operatorie e la stabilità primaria.

In entrambi i gruppi non si sono riscontrate complicanze intra-operatorie e post-operatorie. Tale dato può dipendere anche dal fatto che i casi selezionati erano

tutti caratterizzati da una abbondante quota ossea e dall'assenza di rapporti rischiosi con strutture anatomiche nobili. Indipendentemente da tale risultato restano come indubbi i vantaggi della chirurgia piezoelettrica per la gestione di aree prossime a strutture anatomiche nobili. Il dispositivo piezoelettrico utilizzando una frequenza di 25-30 kHz è in grado di tagliare unicamente i tessuti mineralizzati risparmiando i tessuti molli che necessitano invece una frequenza superiore ai 50 kHz. Pertanto, quando usato correttamente, non è in grado di incidere la membrana schneideriana del seno mascellare, né strutture vascolo-nervose o periostee e può quindi essere utilizzato durante le chirurgie che prevedono l'avvicinamento a tali strutture nobili (Schlee et al. 2006). Tale peculiarità è stata dimostrata da uno studio in vivo su animale di Schareen e colleghi (Sharenn et al. 2008). Gli autori hanno toccato in nervo sciatico di un gruppo di ratti in tre modi differenti:

- Gruppo A: contatto solo con Piezosurgery non attivo, forza operativa per 5 secondi (8 animali).
- Gruppo B: contatto con Piezosurgery attivo, forza operativa per 5 secondi (9 animali).
- Gruppo C: contatto con Piezosurgery attivo, forza di picco per 1 secondo (8 animali).

Gli animali sono stati poi seguiti nel post-operatorio e successivamente sacrificati e sottoposti ad analisi istologica.

In tutti e tre i gruppi alcuni animali hanno mostrato alterazione neurologiche post-operatorie e transitorie che sono rientrate nei due mesi successivi all'intervento. L'analisi istologica in tutti e tre i gruppi non ha mostrato dissezione o danneggiamento del perinervio. In tutti gli animali era presente una degenerazione delle fibre nervose con vari gradi di intensità che però non era collegata ad alterazione motorie cliniche.

Tali risultati hanno portato gli autori a concludere che l'esposizione diretta di un nervo al Piezosurgery, anche negli scenari peggiori, non provoca la sezione del nervo, può comunque indurre alcuni danni strutturali e funzionali generalmente transitori.

Anche per quanto riguarda la stabilità primaria non si sono registrate differenze significative sottolineando come entrambe le metodiche permettano la preparazione di un pozzetto implantare di adeguate dimensioni. Anche su questo punto i risultati in letteratura sono discordanti ((Stacchi et al. 2013, Canullo et al. 2013, Bengazi et al. 2012). Secondo alcuni autori infatti la preparazione piezoelettrica del sito implantare determinerebbe una maggiore stabilità primaria iniziale, un suo minor calo nel primo periodo post-operatorio ed un più veloce passaggio alla stabilità secondaria spostando il momento critico dell'osteointegrazione da 21 a 14 giorni (Stacchi et al. 2013, Canullo et al. 2013). Gli autori hanno attribuito questi risultati alla capacità della chirurgia piezoelettrica di determinare una maggiore detersione del sito chirurgico ed una miglior apertura degli spazi midollari che potrebbe determinare un calo della fase infiammatoria ed un più veloce passaggio alla rigenerazione ossea. Al contrario, altri autori non hanno identificato differenze statisticamente significative in termini di stabilità primaria tra le due metodiche identificando come valide entrambe le sistematiche nel raggiungimento di una stabilità primaria adeguata (Bengazi et al. 2012). Lo studio attuale non è stato disegnato per fornire una valutazione nel tempo della curva della stabilità primaria delle due sistematiche ma unicamente una valutazione intra-operatoria del grado di stabilità primaria ottenuta. Entrambe le sistematiche hanno permesso il posizionamento di impianti con un buon grado di stabilità primaria. Tuttavia, in riferimento alla sistematica piezoelettrica c'è da sottolineare che un ruolo importante nell'ottenimento della stabilità primaria lo può rappresentare la curva d'apprendimento dell'operatore. Il movimento dell'inserito è infatti totalmente diverso dalla sistematica convenzionale, pertanto un operatore meno esperto potrebbe riscontrare problemi nella preparazione di un tunnel implantare preciso.

6. CONCLUSIONI

6. CONCLUSIONI

La chirurgia piezoelettrica si è dimostrata una valida tecnica chirurgica per la preparazione del sito implantare con complicanze simili alla tecnica convenzionale. L' osteo-rigenerazione in seguito a preparazione del sito implantare con le due tecniche è risultata simile facendo ipotizzare che la che la rigenerazione ossea di entrambe le tecniche segua le medesime fasi e tempistiche biologiche.

Tuttavia, considerando la ridotta numerosità campionaria, un aumento del campione è raccomandabile per confermare tali risultati preliminari.

Capitolo 7

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

Bovi M, Manni A, Mavriqi L, Bianco G, Celletti R: The use of piezosurgery to mobilize the mandibular alveolar nerve followed immediately by implant insertion: a case series evaluating neurosensory disturbance. *Int J Periodontics Restor Dent* 2010, 30:73–81.

Canullo L, Peñarrocha D, Peñarrocha M, Rocio AG, Penarrocha-Diago M. Piezoelectric vs. conventional drilling in implant site preparation: pilot controlled randomized clinical trial with crossover design. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Oct 21. doi: 10.1111/clr.12278

Conner J R & Hornick J L SATB2 is a novel marker of osteoblastic differentiation in bone and soft tissue tumours. *Histopathology* 2013; 63, 36–49

Costich, E.R., Youngblood, P.J. & Walden, J.M. (1964) A study of the effects of high speed rotary instruments on bone repair in dogs. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology* 17: 563–571.

Cucchi A, Vignudelli E, Franco S, Corinaldesi G. A minimally invasive approach based on pterygoid and short implants for rehabilitation of an extremely atrophic maxilla: Case Report. Accepted for publication, *Implant Dentistry* 2017.

Danza M, Guidi R, Carinci F: Comparison between implants inserted into piezo split and unsplit alveolar crests. *J Oral Maxillofac Surg* 2009, 67:2460–2465.

Eriksson, R.A. & Albrektsson, T. (1983) Temperature threshold level for heat induced bone tissue injury: a vital microscopic study in rabbit. *Journal of Prosthetic Dentistry* 50: 101–107.

Eriksson, A.R., Albrektsson, T. & Albrektsson, B. (1984) Heat caused by drilling cortical bone. Temperature measured in vivo in patients and animals. *Acta Orthopædica Scandinavica* 55: 629–631.

Ercoli, C., Funkenbusch, P.D., Lee, H.J., Moss, M.E. & Graser, G.N. (2004) The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy preparation for dental implants: A study of drill durability. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 19: 335–349

Esteves JC, Marcantonio E Jr, de Souza Faloni AP, Rocha FR, Marcantonio RA, Wilk K, Intini G. Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling - histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Transl Med.* 2013 Sep 23;11:221. doi: 10.1186/1479-5876-11-221.

Garber DA, Belser UC. Restoration driven implant placement with restoration generated site development. *Compend Contin Educ Dent.* 1995;16:796.

Happe A: Use of a piezoelectric surgical device to harvest bone grafts from the mandibular ramus: report of 40 cases. *Int J Periodontics Restor Dent* 2007, 27:241–249.

Leonhardt, A, Gröndahl, K, Bergstrom, C. & Lekholm, U. Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. *Clinical Oral Implants Research* 2002;13: 127–132.

Hollinger JO, Kleinschmidt JC: The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990, 1:60–68

Lavelle, C. & Wedgwood, D. (1980) Effect of internal irrigation on frictional heat generated from bone drilling. *Journal of Oral Surgery* 38: 499–503.

Lekholm U, Zarb G.A, (1985). Patient selection and preparation. In: Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T, editors. *Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry.* pp. 199-209, Chicago: Quintessence

Ma L, Stubinger S, Liu XL, Schneider UA, Lang NP: Healing of osteotomy sites applying either piezosurgery or two conventional saw blades: a pilot study in rabbits. *Int Orthop* 2013, 37(8):1597–1603.

Matthews, L.S. & Hirsch, C. (1972) Temperatures measured in human cortical bone when drilling. *Journal of Bone and Joint Surgery* 54: 297–308

Maurer P, Kriwalsky MS, Veras RB, Vogel J, Syrowatka F, Heiss C. Micromorphometrical analysis of conventional osteotomy techniques and ultrasonic osteotomy at the rabbit skull. *Clin. Oral Impl. Res.* 19, 2008; 570–575

Karoussis, I.K., Bragger, U., Salvi, G.E., Burgin, W. & Lang, N. Effect of implant design on survival and success rates of titanium oral implants: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clinical Oral Implants Research* 2004; 15: 8–17. ADA Council on Scientific Affairs. Dental endosseous implants: An update. *J Am Dent Assoc.* 2004;135:92-97.

Kazor CE, Al-Shammari K, Sarment DP, et al. Implant plastic surgery: A review and rationale. *J Oral Implantol* 2004;30: 240-254.

Kfoury FD, Duailibi MT, Bretos JL, Carvalho AB, Pallos D, Duailibi SE. Piezoelectric osteotomy for the placement of titanium implants in rabbits: histomorphometry study. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Jul 8. doi: 10.1111/clr.12229.

Pereira CC, Gealh WC, Nogueira LM, Garcia Junior IR, Okamoto R. Piezosurgery applied to implant dentistry: clinical and biological aspects. *Minerva Stomatol.* 2004 May;53(5):207-14.

Piersanti L, Dilorenzo M, Monaco G, Marchetti C. Piezosurgery or conventional rotatory instruments for inferior third molar extractions? *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Sep;72(9):1647-52. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.032. Epub 2014 May 6.

Preti G, Martinasso G, Peirone B, et al. Cytokines and growth factors involved in the osseointegration of oral titanium implants positioned using piezoelectric bone surgery versus a drill technique: a pilot study in minipigs. *J Periodontol* 2007; 78:716–722.

Schaeren S, Jaquier C, Heberer M, Tolnay M, Vercellotti T, Martin I. Assessment of Nerve Damage Using a Novel Ultrasonic Device for Bone Cutting. *J Oral Maxillofac Surg* 66:593-596, 2008

Sammartino G, Trosino O, di Lauro AE, Amato M, Cioffi A. Use of piezosurgery device in management of surgical dental implant complication: a case report. *Implant Dent*. 2011 Apr;20(2):e1-6.

Schlee M, Steigmann M, Bratu E, Garg AK. Piezosurgery: basics and possibilities. *Impl Dent* 2006; 15: 334–337.

Sener, B.C., Dergin, G., Gursoy, B., Kelesoglu, E. & Slih, I. (2009) Effects of irrigation temperature on heat control in vitro at different drilling depths. *Clinical Oral Implants Research* 20: 294–298

Siervo, S., Ruggli-Milic, S., Radici, M., Siervo, P. & Jager, K. Piezoelectric surgery. An alternative method of minimally invasive surgery. *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin* 2004; 114: 365–377.

Sohn D.S., Ahn M.R, Lee W.H, D.S. Yeo, S.Y. Lim. Piezoelectric osteotomy for intraoral harvesting of bone blocks. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007; 127–131.

Sirolli M, Mafra CE, Santos RA, Saraiva L, Holzhausen M, César JB Neto. Influence of Piezosurgery on Bone Healing Around Titanium Implants: A Histological Study in Rats. *Braz Dent J*. 2016 May-Jun;27(3):278-83.

Stacchi C, Vercellotti T, Torelli L, Furlan F, Di Lenarda R. Changes in implant stability using different site preparation techniques: twist drills versus piezosurgery. A single-blinded, randomized, controlled clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Apr;15(2):188-97

Vercellotti T., S. De Paoli, M. Nevins. The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21 (2001), pp. 561–567

Vercellotti T. Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery. *Minerva Stomatol*, 2004; 53: 207–214.

Vercellotti T, Stacchi C, Russo C, Rebaudi A, Vincenzi G, Pratella U, Baldi D, Mozzati M, Monagheddu C, Sentineri R, Cuneo T, Di Alberti L, Carossa S, Schierano G Ultrasonic implant site preparation using piezosurgery: a multicenter case series study analyzing 3,579 implants with a 1- to 3-year follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2014 Jan-Feb;34(1).

Vercellotti T. Piezoelectric surgery in implantology: a case report- a new piezoelectric ridge expansion technique. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000; 358–365.

Vercellotti T, Nevins ML, Kim DM, Nevins M, Wada K, Schenk RK, Fiorellini JP. Osseous response following resective therapy with piezosurgery. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2005 Dec;25(6):543-9.

Ueki K, Nakagawa K, Marukawa K, Yamamoto E. Le Fort I osteotomy using an ultrasonic bone curette to fracture the pterygoid plates. *J Craniomaxillofac Surg*, 2004; 32:pp. 381–386;

Wiggins, K.L. & Malkin, S. (1976) Drilling of bone. *Journal Biomechanical* 9: 553–559

Wallace SS, Mazor Z, Froum SJ, Cho SC, Tarnow DP. Schneiderian membrane perforation rate during sinus elevation using piezosurgery: clinical results of 100 consecutive cases. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007 Oct;27(5):413-9.

Zhang J¹, Tu Q, Grosschedl R, Kim MS, Griffin T, Drissi H, Yang P, Chen J.) *Tissue Eng Part A*. 2011 Jul;17(13-14):1767-76. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0503. Epub 2011 Apr 21. Roles of SATB2 in osteogenic differentiation and bone regeneration.