

# Riparazione o rigenerazione ossea?

Marco Zambellini Artini, Marco Bellanda, Maria Cristina Sacchi\*

\*U.O.A. Ematologia, Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo", Alessandria

## RIASSUNTO

Grazie all'ingegneria tissutale, è oggi possibile pensare di rigenerare i tessuti dell'organismo mediante l'impiego di appropriati mediatori cellulari, molecole di segnale e specifiche matrici. In odontoiatria si è solo agli inizi della nuova era dell'ingegneria tissutale ossea, una scienza emergente, e alquanto promettente, della biologia ricostruttiva che, avvalendosi delle più recenti scoperte nel campo della bioingegneria, dei biomateriali e delle biotecnologie, permette di migliorare i processi di guarigione e di rigenerazione dei tessuti. Questo lavoro vuole, pertanto, essere un contributo concreto per tutti coloro che da anni seguono quelle tecniche chirurgiche riferibili a possibili atti di rigenerazione tissutale, come nel caso della rigenerazione tissutale guidata (GTR) e della rigenerazione ossea guidata (GBR).

## SUMMARY Bone repair or regeneration?

Thanks to tissue engineering, today it is possible to regenerate body tissues through specific cellular mediators, signal molecules and characteristic matrices. Dentistry is only at the beginning of this new era of tissue engineering, the rising and very promising science of restorative biology which, resorting to the most recent studies in the field of bioengineering, biomaterials and biotechnologies, enables to optimise bone wound healing and regeneration. This paper is intended to provide a practical contribution to all those who for years have been following surgical techniques connected with tissue regeneration in general, and guided tissue regeneration (GTR) and guided bone regeneration (GBR) in particular.

Implantologia Orale 2004;2:35-44

L'ingegneria tissutale<sup>1</sup> è un settore emergente e altamente promettente della biologia ricostruttiva che, attingendo dalle più recenti scoperte in discipline quali la bioingegneria, le biotecnologie, la scienza dei biomateriali e la chirurgia, vuole dare risposta alla seguente domanda: "quando un organo o un tessuto è stato danneggiato da un evento patogeno, come possiamo ottenere un ottimale processo rigenerativo?".

In odontoiatria, da diversi anni, vengono utilizzate tecniche chirurgiche riferibili a possibili atti di rigenerazione tissutale, come nel caso della rigenerazione tissutale guidata (GTR) o della rigenerazione ossea guidata (GBR)<sup>2</sup>. In letteratura, esistono oramai molteplici ricerche su tali argomenti; inoltre, negli ultimi anni, sono stati fatti enormi passi avanti nello studio dei biomateriali utilizzabili in chirurgia rigenerativa<sup>3-5</sup>. Sembrerebbe, pertanto, che l'odontoiatria abbia poco da beneficiare dalle recenti scoperte ottenute dall'ingegneria tissutale; tuttavia, un'attenta analisi di quanto pubblicato mette in evidenza che, mentre vi è dovizia di particolari sulle tecniche chirurgiche rigenerative e sui protocolli clinici per il loro impiego, di contro, risultano essere particolarmente carenti le informazioni sui meccanismi fisiopatologici che si attivano una volta che i biomateriali vengono inseriti nell'osso, giocando, in realtà, un ruolo fondamentale nella rigenerazione tissutale. Ed è proprio la scarsa conoscenza di questi processi biologici a precludere, spesso, al clinico la possibilità di ottenere risultati effettivamente predicibili e ottimali. Sono, pertanto, chiaramente intuibili le enormi ripercussioni

che avrebbe, per i clinici, poter avere a disposizione e utilizzare nella pratica quotidiana tutti quegli strumenti capaci di generare, spontaneamente, tessuto osseo. In effetti, è sufficiente pensare alla routinaria necessità di posizionare impianti in modo protesicamente guidato e, quindi, indipendentemente dalla posizione che la quantità di cresta residua consentirebbe, per capirne l'importanza.

## I PROCESSI DI GUARIGIONE

La guarigione dei tessuti avviene o con un processo di riparazione o mediante rigenerazione<sup>6</sup>. La riparazione è la sostituzione di tessuto morto con tessuto di granulazione che maturerà in tessuto cicatriziale; pertanto, obiettivo principale del suddetto processo riparativo è quello di colmare la soluzione di continuo che si produce a seguito di un danno, ottenendo così il ripristino della continuità tissutale ma non della sua architettura e funzione originali. Con il termine di rigenerazione si intende, invece, la sostituzione di cellule e tessuti perduti con nuove cellule e tessuti. Conseguentemente, il risultato finale del processo rigenerativo sarà la *restitutio ad integrum* dell'organo o del tessuto danneggiato, con la formazione di un tessuto con caratteristiche indistinguibili dal materiale originale, ossia con il ripristino della sua forma e funzione primitive. Purtroppo, i processi naturali di guarigione portano spesso alla cicatrizzazione o alla riparazione piuttosto che alla rigenerazione<sup>7</sup>. In effetti, gli studi di biologia delle ferite dimostra-

no che la guarigione, frequentemente, esita in un processo riparativo dei tessuti o organi danneggiati, il che non comporta il recupero delle loro normali proprietà (ad esempio meccaniche) e delle loro funzioni fisiologiche (ad esempio infarto miocardico). Di conseguenza, tutti i più recenti sforzi della scienza medica sono rivolti a far sì che il processo di guarigione di un evento morboso si traduca, costantemente, in un atto rigenerativo. Grazie all'ingegneria tissutale, è oggi possibile rigenerare i tessuti dell'organismo, avvalendosi dell'impiego di appropriati mediatori cellulari e di specifiche matrici<sup>8-10</sup>. Il termine ingegneria tissutale è stato, originariamente, coniato per indicare la costruzione in laboratorio di un dispositivo contenente cellule vitali e peptidi (fattori di crescita e proteine morfogenetiche) in una matrice sintetica o biologica tale da poter essere impiantata nei pazienti per facilitare la rigenerazione di particolari tessuti. In conclusione, si può pensare all'ingegneria tissutale come a quella scienza che utilizza tutti i fattori necessari per poter ottenere una guarigione ottimale, ovvero con ripristino di forma e funzione dell'organo o tessuto lesa. A questo proposito si rende però necessario fare una distinzione tra ingegneria tissutale e biomimetica. Infatti, con il termine biomimetica si intende quella disciplina che studia i meccanismi di guarigione che l'organismo mette in atto per la riparazione di un tessuto e/o di un organo e, in particolare, i tentativi di ricostruire o di mimare processi naturali con l'aspettativa che seguirà un fenomeno rigenerativo. L'ingegneria tissutale è invece la scienza che tende a stimolare e ottimizzare i processi rigenerativi. È così possibile realizzare la ricostituzione in laboratorio di matrici cellulari sulle quali si può indurre lo sviluppo di una ben determinata serie cellulare<sup>7-9</sup>. È, quindi, probabile che in futuro l'ingegneria tissutale possa essere in grado di fornire alcune componenti cellulari che sono andate perse e che si dovranno semplicemente aggiungere.

Nel campo della rigenerazione dell'osso tutto questo ha, conseguentemente, portato a un superamento del concetto di innesto osseo, nel senso che non si deve più ragionare in termini di volume: si innesta l'osso dove manca e, successivamente, verranno messi gli impianti.

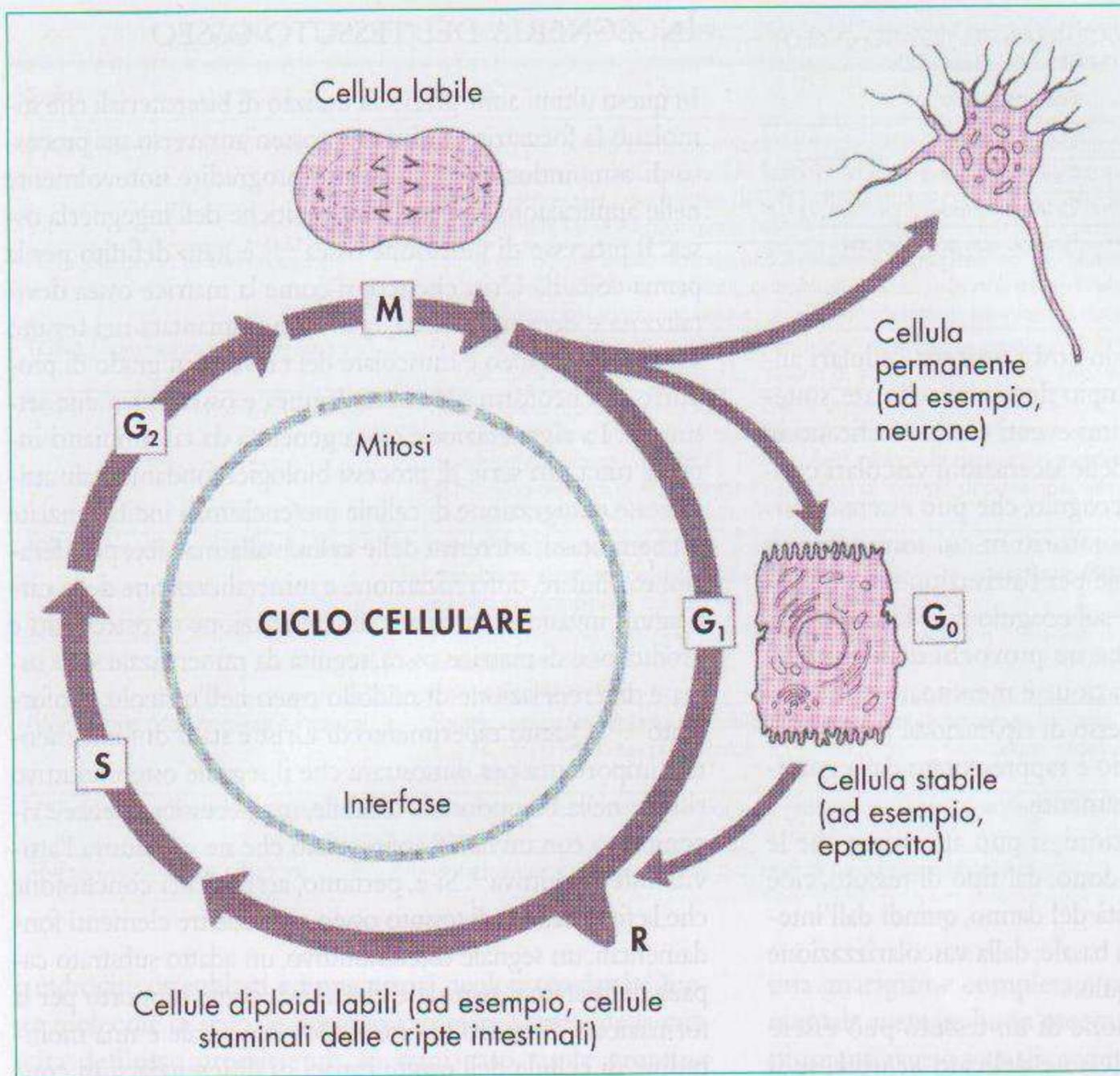
Ora, si deve iniziare a utilizzare nella pratica clinica gli elementi fondamentali dell'ingegneria tissutale:

- le cellule osteoprogenitrici, che sono in grado di differenziarsi in cellule ossee;
- una matrice insolubile, che rappresenta l'impalcatura per la formazione di nuovo osso;
- i segnali osteoinduttivi (fattori di crescita, proteine morfogenetiche), che sembrano svolgere un ruolo critico nella guarigione dell'osso.

Nella genesi di qualunque tessuto intervengono, d'altra parte, tre elementi chiave: le cellule, la matrice extracellulare e

le molecole solubili. Ogni organo, infatti, possiede cellule specializzate e matrici cellulari distinte, e queste differenze conferiscono una certa specificità a livello di organo alla risposta di guarigione. I principali fattori determinanti l'esito finale del processo di guarigione di una ferita sono il tipo e l'estensione del danno, la capacità rigenerativa delle cellule costituenti e l'entità del danno alla trama della matrice extracellulare. Ed è proprio la combinazione di questi fattori che influisce sui risultati: completa rigenerazione e pieno ripristino della normale funzione, o fibrosi e riduzione della capacità funzionale<sup>6</sup>. Si ritiene, pertanto, che la prima condizione necessaria ma non sufficiente perché un tessuto possa rigenerare spontaneamente dopo un danno è rappresentata dal potenziale mitotico proprio delle cellule parenchimali che lo costituiscono. Il corpo umano è una condizione di equilibrio dinamico, fornito di controlli omeostatici sulla proliferazione cellulare e di diversi meccanismi per impedire alle cellule di allontanarsi dal proprio posto. Si intuisce facilmente che, per conservare un'appropriata struttura tissutale, la proliferazione cellulare deve avvenire sotto un rigoroso controllo; pertanto, la conoscenza dei fattori che regolano la divisione cellulare (figura 1) rappresenta un aspetto fondamentale della conoscenza dei processi di guarigione. Non tutte le cellule dell'organismo si dividono alla stessa velocità. Alcune cellule mature non si dividono affatto, mentre altre completano un ciclo ogni 16-24 ore. Le cellule dell'organismo umano vengono, quindi, classificate in base alla loro capacità o meno di replicarsi in: a) cellule labili: continuamente sottoposte a divisione cellulare; b) cellule stabili: una volta giunte a maturazione, non si replicano ma possono dividersi in seguito a uno stimolo appropriato; c) cellule perenni: giunte a maturazione, non hanno più nessun potenziale mitotico. È facilmente intuibile che un eventuale potenziale rigenerativo potrà osservarsi solo a livello dei tessuti costituiti da cellule labili (ad esempio, epidermide, mucosa gastrointestinale, midollo osseo) o da cellule stabili (fegato, endotelio), mentre i tessuti costituiti da cellule perenni (ad esempio, cellule nervose, cellule muscolari cardiache) non possono rigenerare. Tuttavia, sebbene sia le cellule labili che quelle stabili siano dotate di attività proliferativa, non ne consegue necessariamente che lesioni a carico di organi o tessuti composti da tali cellule possano guarire con restituzione della normale struttura e funzione, anche perché il risultato finale del processo di guarigione delle ferite, che può essere risoluzione, cicatrizzazione o deformazione, dipende da una predominanza del processo di riparazione o di rigenerazione. Tipico esempio è dato dalla formazione di cicatrici ipertrofiche e cheloidi, risultato di una deposizione eccessiva di matrice extracellulare nell'area della ferita.

Come detto precedentemente, la risoluzione di un processo di guarigione dipende anche dall'entità e dal tipo di dan-



1. Il ciclo cellulare è l'intervallo tra due mitosi consecutive. Le cellule labili vanno incontro continuamente a replicazione. Dopo la divisione, le cellule entrano nella fase G<sub>1</sub>, in cui si dedicano alle loro attività di specializzazione. Se proseguono il ciclo, dopo aver superato il punto di restrizione (R), entrano in un nuovo ciclo di divisione. La fase G<sub>1</sub> è seguita da un periodo di sintesi del DNA nucleare (S) in cui tutti i cromosomi vengono replicati. La fase S è seguita da una breve fase post-sintetica (G<sub>2</sub>) e quindi dalla mitosi (M) (Rubin e Faber, 1998).

no; questo vuol dire che, ragionando in termini di rigenerazione tessutale, è fondamentale, al fine di permettere un'ordinata sostituzione cellulare, l'integrità dello stroma di supporto o della membrana basale. Quest'ultima, in effetti, sembra costituire la struttura più importante nell'organizzazione di un processo rigenerativo, dal momento che fornisce l'impalcatura necessaria per la replicazione delle cellule parenchimali; d'altra parte, quando la membrana basale è distrutta, le cellule conservano la capacità di proliferare, ma la crescita cellulare sarà del tutto irregolare producendo come risultato masse disorganizzate, prive di alcuna somiglianza con la struttura originaria. Per comprendere meglio questo meccanismo biologico, basta pensare a come può evolvere una lesione epatica. Ad esempio, i virus dell'epatite distruggono in modo specifico gli epatociti, senza però ledere la componente connettivale; pertanto, cessato l'atto infiammatorio di origine virale, il processo rigenerativo ricostituisce il lobulo epatico e i test di funzionalità epatica rientrano nella norma. Viceversa, un ascesso epatico distrugge epatociti e tessuto connettivo di supporto, quin-

di, il suo esito è la disorganizzazione strutturale dovuta a esiti cicatriziali accompagnati da più o meno evidenti segni di iperplasia cellulare compensatoria, oltre alla possibile compromissione dell'architettura. È evidente che nelle lesioni più ampie, che coinvolgono tessuti con potenziale rigenerativo, la rigenerazione può avere inizio dai suoi margini dove sono presenti cellule vitali e proliferanti, mentre le regioni centrali, dove l'impalcatura non è più presente, sono sostituite da tessuto connettivo di tipo cicatriziale. L'andamento del processo rigenerativo è fortemente influenzato dalle condizioni vascolari e meccaniche locali. L'importanza di un'adeguata vascolarizzazione ai fini rigenerativi è facilmente intuibile, dal momento che uno dei primi eventi osservabili durante la guarigione è rappresentato dalla neoformazione di bottoni vascolari: un adeguato apporto vascolare è infatti fondamentale per nutrire le cellule in attiva fase replicativa, per consentire l'accumulo di mediatori solubili che regolano la funzione cellulare, per costituire un tappo di fibrina che tra l'altro agisce come matrice iniziale sopra la quale le cellule precursori possono

Tabella 1 - COMPONENTI EXTRACELLULARI DEL TESSUTO OSSEO

Fase inorganica	Fase organica
Calcio e fosforo	Collagene tipo I
	Collagene tipo III
	Collagene tipo IV
	Proteine non collageniche

migrare e fissarsi, permettendo così i processi cellulari ancoraggio-dipendenti (ad esempio divisione cellulare, sintesi della matrice). Uno dei primi eventi che si verificano in un'area danneggiata a causa delle lacerazioni vascolari consiste nella formazione di un coagulo, che può essere considerato come un piccolo laboratorio in cui sono presenti tutte le componenti necessarie per l'attivazione di un processo rigenerativo; tuttavia, se sul coagulo neo-formato agisce uno stress meccanico che ne provochi distorsione e rottura, il processo di rigenerazione è menomato e, di conseguenza, si sviluppa un processo di riparazione per fibrosi. A questo riguardo, un esempio è rappresentato dalla guarigione di una frattura adeguatamente.

Sulla base di queste osservazioni, si può affermare che le possibilità rigenerative dipendono: dal tipo di tessuto, cioè dalle cellule presenti; dall'entità del danno, quindi dall'integrità o meno della membrana basale; dalla vascolarizzazione e stabilità meccanica del coagulo.

In conclusione, la rigenerazione di un tessuto può essere interpretata come un complesso e delicato *network*, se si considera questo processo come il risultato di più fattori che interagiscono tra loro secondo un perfetto schema. Eventuali errori, peraltro frequenti, non sono ammessi perché porterebbero, mediante sostituzione con tessuto connettivo, a un processo di riparazione che esita in cicatrice per ripristinare la continuità tessutale ma a discapito di forma e funzione.

Negli ultimi anni molto si è imparato sui meccanismi alla base dei processi rigenerativi spontanei e sui processi che regolano la morfogenesi, tanto che oggi si può affermare che la rigenerazione altro non è che una ricapitolazione dei processi morfogenetici. In effetti, gli elementi chiave sia del processo rigenerativo che della morfogenesi<sup>7,11</sup> sono: cellule vitali e proliferanti; matrice di supporto (impalcatura o *scaffold*); mediatori solubili che regolano e modulano la funzione cellulare. Ed è proprio su questi tre fattori che i ricercatori hanno focalizzato la loro attenzione, al fine di poter ottenere la rigenerazione di organi o tessuti danneggiati da eventi patogeni. Si può, pertanto, considerare l'ingegneria tessutale come quella scienza il cui obiettivo consiste nel tentativo di riprodurre ciò che si è formato durante l'embriogenesi.

## INGEGNERIA DEL TESSUTO OSSEO

In questi ultimi anni, grazie all'utilizzo di biomateriali che stimolano la formazione di tessuto osseo attraverso un processo di osteoinduzione, si è potuto progredire notevolmente nelle applicazioni cliniche e terapeutiche dell'ingegneria ossea. Il processo di induzione ossea<sup>12,13</sup> è stato definito per la prima volta da Urist che scoprì come la matrice ossea devitalizzata e demineralizzata, una volta impiantata nel tessuto osseo sottocutaneo e muscolare del ratto, sia in grado di produrre una neoformazione cartilaginea e ossea entro due settimane. La rigenerazione ossea generata da tali impianti include tutta una serie di processi biologici fondamentali: attivazione e migrazione di cellule mesenchimali indifferenziate o chemiotassi, aderenza delle cellule alla matrice, proliferazione cellulare, differenziazione e mineralizzazione della cartilagine, invasione vascolare, differenziazione di osteoblasti e produzione di matrice ossea, seguita da mineralizzazione ossea e differenziazione di midollo osseo nell'ossicolo neoformato<sup>13,14</sup>. Questo esperimento di Urist è stato di fondamentale importanza per dimostrare che il segnale osteoinduttivo risiede nella componente solubile, ma necessita di essere ricomposto con un *carrier* appropriato che ne promuova l'attività osteoinduttiva<sup>15</sup>. Si è, pertanto, arrivati alla conclusione che la formazione di tessuto osseo richiede tre elementi fondamentali: un segnale osteoinduttivo, un adatto substrato capace di liberare il segnale e che agisca come supporto per la formazione di nuovo tessuto osseo encondrale e una moltitudine di cellule dell'ospite capaci di differenziarsi in condroblasti e osteoblasti<sup>16</sup>.

L'osso è un tessuto dinamico che si rimodella continuamente per tutto l'arco della vita e le sue proprietà dipendono dalla componente extracellulare, la cui struttura è costituita da due fasi: una solida minerale e una organica in stretta associazione (tabella 1). Il modellamento, così come il rimodellamento e il processo di riparazione, sono regolati da fattori ormonali sistemici e da fattori locali che esercitano il loro effetto su osteoclasti e osteoblasti, inducendo la differenziazione e la replicazione di cellule indifferenziate, il reclutamento di cellule, la diversificazione delle funzioni cellulari.

## I FATTORI DI CRESCITA

È oramai universalmente riconosciuto che i fattori di crescita (*Growth Factors*, GFs), e tra questi in particolare le proteine morfogenetiche, svolgono un ruolo di primaria importanza nel rimodellamento, nella rigenerazione e nelle fasi di guarigione sia dei tessuti molli che di quelli duri<sup>8-10,17</sup>. I GFs regolano la proliferazione e l'espressione di fenotipi differenziati per molte popolazioni cellulari, comprendendo

Tabella 2 · FATTORI DI CRESCITA COINVOLTI NEI PROCESSI DI GUARIGIONE E DI RIGENERAZIONE OSSEA

Sigla	Attività
PDGF ( <i>Platelet Derived Growth Factor</i> )	Mitogeno per cellule staminali e fibroblasti; stimola la chemiotassi, l'angiogenesi e la sintesi di collagene, up-regolazione di altri GFs e cellule (stimolazione di fibroblasti e osteoblasti, induzione della differenziazione cellulare, incremento degli effetti di GFs su cellule quali i macrofagi); svolge un ruolo importante nel rimodellamento e nella guarigione ossea
FGFs ( <i>Fibroblast Growth Factors</i> )	Polipeptidi acidi e basici; favoriscono il processo angiogenetico, la chemiotassi e la mitogenesi; stimolano la crescita di fibroblasti, mioblasti, osteoblasti, cellule neuronali ed endoteliali; hanno un ruolo importante nello sviluppo dei sistemi vascolare, nervoso e scheletrico; stimolano il riparo e la guarigione dei tessuti
TGF- $\alpha$ ( <i>Transforming Growth Factor<math>\alpha</math></i> )	Prodotto da cheratinociti, macrofagi, epatociti, piastrine. Le proprietà di TGF- $\alpha$ sono alquanto simili a quelle di EGF. Stimola la chemiotassi e la crescita di cellule mesenchimali, endoteliali, epiteliali
TGF- $\beta$ ( <i>Transforming Growth Factor<math>\beta</math></i> )	Sintetizzato da piastrine, macrofagi, cellule endoteliali, cheratinociti e condrociti; stimola: la sintesi di collagene, la chemiotassi e la proliferazione di fibroblasti, la replicazione dei precursori cellulari della linea osteoblastica; libera FGF, PDGF, TNF- $\alpha$ , IL-1; inibisce la degradazione della matrice bloccando la sintesi di metalloproteinasi e incrementando la sintesi di inibitori di proteinasi; stimola l'inibizione di cellule epiteliali, endoteliali, di osteoclasti e il riassorbimento osseo
IGF I/II ( <i>Insulin-Like Growth Factors</i> )	Attività insulina-simile; stimolano le cellule epiteliali e mesenchimali; esercitano i loro effetti sui precursori degli osteoblasti; stimolano la replicazione di cellule della linea osteoblastica; accentuano la sintesi del collagene e della matrice ossea; accelerano i processi di guarigione
EGF ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )	Possiede una forte omologia con TGF- $\alpha$ ; influenza la sintesi e il turnover di proteine della matrice extracellulare quali la vitronectina, il collagene, la laminina e i glicosaminoglicani; stimola l'angiogenesi e la ripielizzazione
BMPs ( <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> )	Possiedono proprietà inequivocabilmente osteoinduttive; rivelano un ruolo importante nella guarigione delle fratture, dei difetti ossei parodontali, e nell'induzione di formazione ossea intorno agli impianti e ai restauri protesici
CSFs ( <i>Colony Stimulating Factors</i> )	Stimolano la formazione di colonie di granulociti e granulociti/macrofagi (GM) agendo sul metabolismo osseo
TNFs ( <i>Tumor Necrosis Factors</i> )	Hanno un ruolo importante nel processo di rimodellamento osseo

condrociti, osteoblasti e i precursori degli osteoclasti. Queste molecole di segnale possono cambiare l'entità della crescita dell'osso preesistente. In ogni caso, sia le proteine morfogenetiche che i fattori di crescita agiscono come fattori trascrizionali che regolano la proliferazione e la differenziazione delle cellule mesenchimali<sup>8</sup>.

I GFs vengono raggruppati in diverse famiglie, ciascuna delle quali possiede caratteristiche e proprietà specifiche. Nella tabella 2 vengono riassunte le funzioni principali dei fattori di crescita che si ritiene siano coinvolti nei processi di guarigione e di rigenerazione ossea. I GFs esercitano la loro azione legandosi a recettori presenti sulla superficie cellulare<sup>18</sup>, rappresentati principalmente da chinasi transmembrano-se. I recettori per IGF, PDGF, FGF, EGF e altri GFs appartengono al gruppo delle tirosin-chinasi<sup>19,20</sup> e agiscono come segnali attraverso la formazione di complessi eteromerici, che comunicano con il nucleo e regolano l'espressione di proteine determinanti per la funzione cellulare<sup>21</sup>. I recettori per la superfamiglia TGF- $\beta$ , incluse le BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), si legano invece a serin/treonin-chinasi<sup>22-24</sup>. Tutti i GFs sono regolati da un meccanismo di *feed-back*, nel senso che la quantità di mediatore influenza la produzione dello stesso in maniera positiva o negativa, a seconda delle necessità biologiche.

Sulla base di queste osservazioni, si capisce che per ottenere

una guarigione completa e rapida di un innesto, è fondamentale avere un buon meccanismo di guarigione. I meccanismi attraverso i quali avviene la guarigione degli innesti ossei sono tre:

- osteogenesi: processo di formazione e sviluppo dell'osso;
- osteoinduzione: processo che stimola l'osteogenesi;
- osteoconduzione: processo biologico che fornisce una matrice fisica o una impalcatura rigida di sostegno alle nuove cellule ossee.

Le capacità osteogenetiche del midollo osseo sono note a tutti fin dal 1964, grazie alle osservazioni di Boujou, come riportato da Burwell<sup>25</sup>. Il midollo osseo contiene cellule osteoprogenitrici nell'ordine di 1 su 50.000 cellule nucleari nei giovani e 1 su 2.000.000 negli anziani. Tutto questo ci fa capire che l'osteogenesi va potenziata con mediatori chimici. In effetti, grazie a certe tecniche di concentrazione dei GFs, è stato possibile aumentare il numero delle cellule osteoprogenitrici di 5 volte<sup>9</sup>.

Studi recenti hanno dimostrato che è possibile isolare un diverso numero di GFs dalla matrice ossea mineralizzata; tra questi troviamo: il sistema dei PDGFs; gli FGFs; gli IGFs; il sistema del TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ .

- Sistema dei PDGFs (*Platelet Derived Growth Factors*). È stato isolato per la prima volta nel circolo sanguigno dalle piastrine e viene prodotto da tessuti normali e neoplastici a

conferma della sua capacità di azione come regolatore sistemico o locale di crescita tessutale. È un dimero mitogeno per le cellule staminali presenti nell'innesto osseo, in grado di stimolare il riassorbimento osseo e la replicazione cellulare; inoltre, è un fattore angiogenetico che stimola la crescita delle cellule endoteliali, permettendo così di ottenere una neovascolarizzazione dell'innesto. Infine, diversi studi hanno dimostrato che il PDGF si comporta anche come un fattore chemiotattico verso i fibroblasti e i condroblasti, che vengono così richiamati in sede osteogenica e, conseguentemente, indotti a produrre osso<sup>26-31</sup>. Il PDGF svolge, pertanto, un'importante azione nel rimodellamento e nella guarigione ossea, pur non agendo direttamente sulla funzione differenziata dell'osteoblasto.

- **FGFs (Fibroblast Growth Factors)**. Sono polipeptidi acidi e basici, leganti l'eparina, sintetizzati dal sistema nervoso centrale e da una varietà di tessuti normali e maligni, che rivestono un ruolo di primaria importanza nel processo di riparazione e rigenerazione tessutale<sup>32,33</sup>. Sono stati identificati diversi FGFs, ma quelli maggiormente studiati sono: FGF acido (aFGF) e FGF basico (bFGF) che esercitano un'attività significativa sui meccanismi di guarigione ossea. Gli FGFs acidi e basici contenuti nell'osso stimolano la replicazione cellulare e la sintesi di collagene attraverso l'aumentato numero di cellule. Non sembrano, invece, modificare il riassorbimento o la degradazione della matrice. Sono, inoltre, in grado di favorire l'angiogenesi, evento sicuramente fondamentale per indurre la formazione di tessuto osseo<sup>34</sup>.

- **IGFs (Insulin-Like Growth Factors)**. Fattori di crescita insulino-simili, sono stati identificati come polipeptidi ormono-dipendenti e si distinguono in IGF-I e II. Gli IGFs sono sintetizzati da più tessuti, incluso l'osso, e possiedono proprietà biologiche simili<sup>21,35-38</sup>, anche se l'IGF-I è circa sette volte più potente dell'IGF-II<sup>39,40</sup>. Il processo di sintesi di tali GFs sembra essere mediato da fattori quali il PTH, le prostaglandine E2 e la  $\beta 2$  microglobulina<sup>41</sup>. Inoltre, le cellule dell'osso secerano proteine leganti gli IGFs, che possono neutralizzare o rafforzare l'attività biologica di tali fattori o essere coinvolte nel trasporto degli IGFs alle cellule bersaglio. Recentemente è stato dimostrato, con analisi biochimiche e istomorfiche, che l'IGF-I accentua la sintesi del collagene e della matrice ossea e che stimola la proliferazione e la differenziazione di cellule della linea osteoblastica<sup>36-38</sup>. In effetti, stimola gli osteoblasti presenti nell'endostio, che è noto avere una grande capacità osteogenica<sup>7,41-47</sup>. È, quindi, probabile che l'IGF-I giochi un ruolo fondamentale nel processo di formazione ossea e nel mantenimento di tale massa.

Gli IGFs prodotti dalle cellule ossee non solo agiscono come regolatori autocrini e paracrini, ma vengono anche incorporati nella matrice calcificata e rilasciati durante le fasi di riassorbimento<sup>48</sup>.

- Il sistema del TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\alpha$  e  $\beta$* ). Sono polipeptidi che giocano molteplici funzioni nella regolazione del normale metabolismo cellulare<sup>18</sup>. Rappresentano, probabilmente, i GFs più indagati nella biologia dell'osso. La superfamiglia del TGF- $\beta$  comprende i TGF- $\beta$ s, le activine, le BMPs e costituisce un insieme di molecole di segnalazione che vengono secrete per regolare molteplici aspetti della funzione cellulare<sup>5,48-50</sup>. È stato dimostrato che il TGF- $\beta$  esogeno può stimolare la riparazione dell'osso grazie alla sua capacità osteoinduttiva, del tutto paragonabile a quella delle proteine morfogenetiche<sup>51</sup>. In effetti, è stato dimostrato che questo GF, sintetizzato da molti tessuti incluso l'osso, sembra in grado di indurre la replicazione dei precursori cellulari della linea osteoblastica e avere un effetto stimolatorio diretto sulla sintesi del collagene osseo. Inoltre, diminuisce il riassorbimento osseo, poiché i suoi valori aumentano significativamente in presenza di ormoni, quali il PTH, che favoriscono i processi degradativi. Il TGF- $\beta$  potrebbe addirittura potenziare le attività osteoinduttive delle proteine morfogenetiche<sup>48-51</sup>.

Sulla base di queste osservazioni, è facilmente intuibile che il processo di guarigione e di rigenerazione ossea comporta una complessa interazione di molti fattori di regolazione locali e sistemici<sup>51-58</sup>, risultato di meccanismi autocrini e paracrini, che stimola le cellule mesenchimali indifferenziate a migrare, proliferare e differenziare in sede di innesto. La fase iniziale della rigenerazione è caratterizzata dal rilascio, in sede di innesto, di PDGF, TGF- $\beta$  e IGF-I e II, mediante degranolazione delle piastrine<sup>11</sup>. Il PDGF, da un lato, stimola la proliferazione delle cellule staminali midollari presenti nell'innesto osseo così da aumentare il loro numero di diversi ordini di grandezza, dall'altro, grazie alla sua azione angiogenetica, determina la formazione di nuovi capillari nell'innesto. Nello stesso tempo, il TGF- $\beta$ , che è mitogeno per i fibroblasti e per i preosteoblasti, aumenta specificamente il numero di queste cellule. Successivamente, il TGF- $\beta$  promuove la differenziazione dei preosteoblasti verso forme più mature. La secrezione continua di TGF- $\beta$  influenza, da un lato, gli osteoblasti a rilasciare matrice ossea, dall'altro i fibroblasti a depositare matrice di collagene necessaria a supportare la crescita dei capillari<sup>59</sup>. Gli IGF-I e II agiscono sugli osteoblasti dell'endostio, che possono così iniziare a tracciare le trabecole dell'osso spugnoso innestato. In conclusione, questa iniziale ventata di attività cellulari non è altro che il risultato diretto della complessa interazione di questi tre fattori di crescita (PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-I e II), il cui *target* è quello di determinare un rapido aumento del numero delle cellule staminali capaci di accelerare i processi di guarigione e di rigenerazione che in un organismo adulto sono presenti in numero limitato<sup>60</sup>.

Non bisogna poi dimenticare il ruolo svolto da altri GFs e

Tabella 3 - SUPERFAMIGLIA DELLE PROTEINE MORFOGENETICHE DELL'OSSO (BMPs) NEI MAMMAIFERI

BMP gene	Denominazione	BMP proteina
BMP 2/4	BMP 2 BMP 2	BMP 4 BMP 4
BMP 3	Osteogenina Fattore di crescita della differenziazione 10 (Growth Differentiation factor/GDF 10)	BMP 3 BMP 3B
OP 1/BMP 7	BMP-5 Vegetal related 1 (Vgr 1) Proteina osteogenica 1 (OP 1) Proteina osteogenica 2 (OP 2) Proteina osteogenica 3 (OP 3)	BMP 5 BMP 6 BMP 7 BMP 8 BMP 8B
Miscellanea	Fattore di crescita della differenziazione 2 (GDF 2) Fattore di crescita della differenziazione 11 (GDF 11) BMP 10	BMP 9 BMP 11 BMP 10
Proteina morfogenetica della cartilagine/ Fattore di crescita della differenziazione	Proteina morfogenetica della cartilagine 3 (CDMP 3) o Fattore di crescita della differenziazione 7 (GDF 7) Proteina morfogenetica della cartilagine 2 (CDMP 2) o Fattore di crescita della differenziazione 6 (GDF 6) Proteina morfogenetica della cartilagine 1 (CDMP 1) o Fattore di crescita della differenziazione 5 (GDF 5)	BMP 12 BMP 13 BMP 14
Altro	BMP 15 BMP 16	BMP 15 BMP 16

(Reddi AH, 1998)

citochine che, seppure in maniera minore, sono coinvolti nel metabolismo osseo<sup>61</sup>. In particolare, studi sperimentali hanno dimostrato che sia le interleuchine (ILs) -1, -4, -6 e -11 che i fattori stimolanti le colonie (CSFs, *Colony Stimulating Factors*) di granulociti e granulociti/macrofagi (GM) e i fattori di necrosi tumorale (TNFs, *Tumor Necrosis Factors*) rivestono tutti un ruolo importante nel rimodellamento osseo<sup>48</sup>. Infine, un altro GF che pare essere presente solo nel cemento è il CGF (*Cementum-Derived Growth Factor*)<sup>62</sup>.

Ai fini osteoinduttivi è ben nota l'azione di un'intera famiglia di proteine chiamate collettivamente proteine morfogenetiche dell'osso (*Bone Morphogenetic Protein, BMPs*)<sup>3-5,48-50</sup>. Dati della letteratura<sup>59,63-65</sup> hanno dimostrato che le BMPs sono membri di una ben più vasta famiglia, la superfamiglia dei *Transforming Growth Factors*,  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), che include le attivine, le inibine, almeno cinque sequenze di proteine TGF- $\beta$ , i GFs e le proteine morfogenetiche di origine cartilaginea (*Cartilage Derived Morphogenetic Proteins, CDMPs*)<sup>5,48-50</sup> (tabella 3). I membri della famiglia delle BMPs sono fattori morfogeni e non mitogeni, con la potenzialità di indurre le cellule a differenziare e a formare osso endocondrale in localizzazioni ectopiche ed eterotopiche<sup>8</sup>. Le BMPs svolgono una funzione pleiomorfica che va dall'organogenesi extracellulare e scheletrica alla generazione dell'osso e alla rigenerazione, in particolar modo con effetti variabili e potenti sulla migrazione, proliferazione e differenziazione cellulare e sulla sintesi della matrice extracellulare. Attualmente sono state clonate molte sequenze aminoacidiche di BMPs ed espresse per via ricombinante<sup>4,5,48</sup>. Studi sperimentali hanno dimostrato che

circa 30 BMPs e le proteine osteogeniche 1 e 2 (*Osteogenic Proteins, OP-1 e OP-2*, anche chiamate BMP-7 e BMP-8), ricostituite con il segnale insolubile e inattivo della matrice ossea collagenica, possiedono la capacità di generare *de novo* tessuto cartilagineo e osseo per induzione quando impiantate in tessuti extrascheletrici in animali da laboratorio<sup>4,5,48-50</sup>. Nel caso specifico della chirurgia implantare, le proteine morfogenetiche sembrano in grado di stimolare la formazione di nuovo osso nel sito dell'impianto<sup>50</sup>. In conclusione, è oggi possibile affermare che le BMPs rappresentano un gruppo di GFs inequivocabilmente osteoinduttivi, in considerazione del fatto che sono in grado di favorire i processi di guarigione delle fratture, dei difetti parodontali<sup>48-50</sup>. Non bisogna, infine, dimenticare che le BMPs non solo hanno un ruolo critico nell'induzione dello sviluppo di cartilagine e osso, ma agiscono anche come mediatori solubili nella morfogenesi di molti tessuti e organi, quali rene, sistema nervoso centrale e periferico, cuore, denti, gonadi, pelle, fegato, polmone<sup>5</sup>. Studi recenti hanno dimostrato che, affinché le BMPs possano essere utilizzate in ambito clinico, è richiesto un substrato *carrier* capace di liberare localmente BMPs ricombinanti umane per evocare così la risposta osteogenica desiderata. Pertanto, il problema critico che l'ingegneria tissutale si trova a dover risolvere è costituito dallo sviluppo di biomateriali osteoinduttivi capaci di ottimizzare il rilascio di BMPs e dei GFs e, conseguentemente, della loro attività biologica<sup>16</sup>. In effetti, l'attenzione dei ricercatori è ora volta alla realizzazione di un efficace e specifico sistema di rilascio di tali mediatori, così da determinarne la loro liberazione selettiva. Sono state

ipotizzate due possibili strategie per veicolare i GFs nel sito del difetto osseo<sup>16</sup>: la prima prevede l'utilizzo di biomateriali in grado di incorporare i GFs e di rilasciarli successivamente nel sito prestabilito; la seconda implica, invece, l'uso di biomateriali intrinsecamente osteoinduttivi, vale a dire capaci di indurre formazione ossea spontanea senza previa applicazione di GFs esogeni, che verrebbero somministrati localmente<sup>66,67</sup>. Quest'ultima teoria trova un fondamento razionale partendo dall'osservazione che questi GFs hanno in sé la capacità di sequestrare spontaneamente tali mediatori, normalmente circolanti nel sangue, facendoli concentrare in quel determinato sito dove è richiesta la loro azione. Sebbene le ricerche effettuate recentemente sulla preparazione di un biomateriale intrinsecamente osteoinduttivo caricato con BMPs siano molto confortanti, al momento, l'obiettivo che si vuole raggiungere avvalendosi dei principi dell'ingegneria tissutale è quello di generare osso mediante l'impianto di soli biomateriali in grado di indurre specifiche risposte dai tessuti vicini senza l'aggiunta di BMPs esogene, bensì utilizzando quelle endogene. Dal momento che un bioprodotto con queste caratteristiche non è attualmente disponibile, gli sforzi devono essere necessariamente concentrati sullo sviluppo di biomateriali, così da ottenere un'adeguata matrice di supporto. Sulla base di queste osservazioni, è facilmente intuibile che le ricerche più avanzate nel campo della rigenerazione riguardano il terzo fattore della triade dell'ingegneria tissutale: la matrice di supporto.

## I BIOMATERIALI

Negli ultimi anni la scienza dei biomateriali è stata così prolifica che, al momento, ne esistono disponibili in commercio molteplici tipi. Questo ha però generato una grande confusione. Per tentare di fare chiarezza, è importante differenziare un biomateriale osteoinduttivo da un biomateriale osteoconduttivo. La bioattività discriminante di tali materiali è l'osteogenesi per induzione. Un materiale osteoinduttivo possiede un'attività osteogenetica intrinseca. Un biomateriale osteoconduttivo ha la capacità di guidare la crescita dell'osso sulla sua interfaccia e ottenere così l'osteointegrazione quando l'impianto viene fatto in siti scheletrici o ortotopici. Il lavoro di Urist e Reddi ha, senza dubbio, segnato il punto di svolta sui biomateriali osteoinduttivi. Grazie a studi compiuti su animali da esperimento, è stato così possibile comprendere che si può parlare di osteoinduzione solo quando istologicamente si mette in evidenza la presenza di tessuto cartilagineo e di osso encondrale in siti di impianto extrascheletrici. Nel 1981, il lavoro di Sampath e Reddi ha contribuito alla comprensione di un altro aspetto fondamentale, vale a dire che la capacità osteoinduttiva della ma-

trice ossea extracellulare, osservata anni prima da Urist, viene annullata quando si esegua l'estrazione dissociativa della matrice demineralizzata, ma viene ripristinata quando la componente proteica estratta, di per sé inattiva, viene ricombinata con il residuo inattivo, prevalentemente composto da matrice collagenica insolubile<sup>15</sup>. Questo importantissimo esperimento ha dimostrato che il segnale osteoinduttivo risiede nella componente solubile, proteica, ma necessita di essere ricomposto con un *carrier* appropriato che ne promuova l'attività osteoinduttiva<sup>15</sup>.

In questi ultimi anni è stato messo in evidenza che l'uso di BMPs ricombinanti o native, estratte dalla matrice ossea (componente solubile) in associazione a *carrier* collagenici, è un metodo sicuro ed efficace per la rigenerazione di difetti ossei in ortopedia e in chirurgia craniofacciale, come dimostrato dagli esperimenti compiuti su animali da laboratorio, inclusi i primati<sup>3,5,48</sup>. È chiaro quindi che l'aver compreso che l'induzione ossea dipende dall'azione combinata di due componenti complementari tra di loro (BMP e substrato insolubile) è di estrema importanza per le future applicazioni cliniche.

La scoperta che i substrati biocompatibili possono condizionare e controllare l'attività osteogenetica delle BMPs, ha indotto i ricercatori a focalizzare la propria attenzione sullo studio di nuovi materiali biomimetici, capaci di veicolare le BMPs precedentemente aggiunte al substrato. Si è così giunti a stabilire che un biomateriale ideale per l'ingegneria ossea ricostruttiva dovrebbe essere non immunogeno, biocompatibile e biotollerabile, modellabile per poter essere adattato ai vari difetti ossei anatomicamente differenti, sufficientemente resistente per sopportare le eventuali sollecitazioni meccaniche<sup>16</sup>. È, inoltre, importante sottolineare che tale biomateriale dovrebbe promuovere l'attività osteogenica delle BMPs, così che sia possibile, pur applicando una bassa concentrazione di principi attivi e morfogenetici, favorire comunque una rapida invasione cellulare ma, soprattutto, vascolare per ottimizzare il contatto cellulare con le proteine stesse, precedentemente adsorbite dal substrato insolubile. Una volta incorporato nel tessuto osseo neoformato, tale biomateriale dovrebbe essere suscettibile di rimodellamento e riassorbimento, quando il processo di rigenerazione è completato<sup>16</sup>. Ovviamente, questo *carrier* non deve essere cancerogeno e teratogeno. Infine, deve essere sterilizzabile ed economico. Attualmente l'unico materiale che presenta tutte queste caratteristiche è l'osso autologo, biomateriale per eccellenza, visto che è l'unico a possedere contemporaneamente attività osteogenica, osteoinduttiva e osteoconduttiva, che nell'insieme rappresentano i tre meccanismi che intervengono nella rigenerazione ossea sia fisiologica (rimodellamento osseo durante tutta la vita) che riparativa (attività che segue a qualunque danno osseo).

I biomateriali attualmente disponibili permettono una guarigione ossea, sfruttando in modo più o meno efficace solo le proprietà osteoconduttive e/o osteoinduttive. D'altra parte è chiaro che l'innesto di osso autologo, pur nella sua efficacia clinica, non può essere considerato il punto di arrivo nella chirurgia ossea rigenerativa per diversi motivi: innanzitutto per il fatto che necessita di un intervento aggiuntivo per il prelievo dell'osso con conseguente morbidità (dolore, emorragie, rischio di infezioni nella sede del prelievo); in secondo luogo la quantità di materiale disponibile che può essere prelevata è, generalmente, limitata. Pertanto, la situazione ideale sarebbe quella di poter disporre di un dispositivo in grado di promuovere la rigenerazione direttamente e limitatamente all'area danneggiata. Sulla base di queste osservazioni nasce il concetto nuovo e stimolante dell'ingegneria tissutale ossea dell'induzione *de novo* di tessuto osseo che si sviluppa dopo l'impianto di materiali biomimetici. In definitiva, un biomateriale ideale per l'ingegneria tissutale ossea deve assolutamente possedere un'attività osteoinduttiva.

## CONCLUSIONI

Gli Autori, in questo articolo, hanno voluto sottolineare il ruolo svolto dall'ingegneria tissutale quale scienza della rigenerazione di organi e tessuti. Poiché la conoscenza dei principi biologici su cui si fonda questa emergente branca medica è di fondamentale importanza per poterne sfruttare appieno le potenzialità, si è cercato, attraverso una revisione della letteratura, di riproporre i dogmi fondamentali.

*Corrispondenza:* Maria Cristina Sacchi  
via Osvaldo Remoti 4, San Michele (AL)  
tel. 333 2106911 - fax 0131 224397  
e-mail: dott.chris@tiscalinet.it

## BIBLIOGRAFIA

1. Reddi AH. Symbiosis of biotechnology and biomaterials: applications in tissue engineering of bone and cartilage. *J Cell Biochem* 1994;56:192-5.
2. Atlante di parodontologia clinica. Scienza e Tecnica Dentistica. Milano: Edizioni Internazionali, 2001.
3. Ripamonti U, Duneas N. Tissue engineering of bone by osteoinductive biomaterials. *Mat Res Soc Bull* 1996;21:36-9.
4. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology* 1998;16:247-52.
5. Ripamonti U, Duneas N. Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:227-39.
6. Rubin E, Faber JL. Pathology. Philadelphia: JB Lippencott, 1988.
7. Lynch S.E. Introduction. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:179-98.
8. Boden SD. Bioactive Factors for Bone Tissue Engineering. *Clin Orthop* 1999;367:584-94.
9. Lane JM, Tomin E, Bostrom MPG. Biosintetic Bone Grafting. *Clin Orthop* 1999;367 Suppl:S107-17.
10. Bostrom MPG, Asnis P. Transforming Growth Factor Beta in Fracture Repair. *Clin Orthop* 1999;355S:124-31.
11. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:179-98.
12. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science (Wash. DC)* 1965;159:893-9.
13. Reddi AH, Huggins CB. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1601-5.
14. Reddi AH. Cell Biology and biochemistry of endochondral bone development. *Collagen Rel Res* 1981;1:209-26.
15. Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7599-603.
16. De Franco M, Mangano C, Fornara R, Piattelli A. Fattori di crescita e biomateriali. In: Masson (ed). *Rigenerazione ossea in odontostomatologia*. Milano: Masson, 2000.
17. Wozney JM, Rosen V. Bone Morphogenetic Protein and Bone Morphogenetic Protein Gene Family in Bone Formation and Repair. *Clin Orthop* 1998;346:26-37.
18. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. Signaling via enzyme-linked cell-surface receptors. In: *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. New York & London: Garland Publ. Inc, 1994; 15: 759-71.
19. Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992;9:383-91.
20. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-12.
21. Linkhart TA, Mohan S, Baylink D. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF- $\beta$  and BMP. *Bone* 1996;19:1S-12S.
22. Lin HY, Lodish HF. Receptors for the TGF- $\beta$  superfamily: multiple polypeptides and serine/threonine kinases. *Trends Cell Biol* 1993; 3:14-9.
23. Massague J. Receptors for the TGF- $\beta$  famil. *Cell* 1992;69:1067-70.
24. Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, et al. Expression of TGF- $\beta$  superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res* 1997;76:1555-60.
25. Burwell R. Studies in the transplantation of bone VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone: an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone graft. *J Bone Joint Surg* 1985;46B:110-40.
26. Graves DT, Cochram DL. Mesenchymal Cell Growth Factors. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990;1:17-36.
27. Zhang L, Leeman E, Carnes DC Jr, Graves DT. Human Osteoblasts Synthesize and respond to Platelet-Derived growth factor. *Am J Physiol* 1991;261:C348-54.
28. Giannobile WV, Whitson SW, Carlson MR, Lynch SE. Immunoneutralization of platelet derived Growth factor (PDGF)-like mitogens from mineralizing osteoblasts [abstract]. *J Bone Miner Res* 1993;8:S363.
29. Rydziel S, Shaikh S, Canalis E. Platelet-Derived Growth Factor-AA and -BB (PDGF-AA and -BB) enhanced synthesis of PDGF-AA in bone cell cultures. *Endocrinology* 1994;134:2541-6.

30. Hoch JM, Canalis E. Platelet-derived Growth factor enhanced bone cell replication but not differentiated function of osteoblast. *Endocrinology* 1994;134:1423-8.
31. Hughes FJ, Aubin JE, Heersche JN. Differential chemotactic responses of differential populations of fetal rat calvarian cells to platelet derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone Miner* 1992;19:63-74.
32. Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, et al. Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clinic Orthop and Relat Res* 1998;355S:S283-93.
33. Hu MC, Wang YP, Qiu WR. Human fibroblast growth factor-18 stimulates fibroblast cell proliferation and is mapped to chromosome 14p11. *Oncogene* 1999;18:2635-42.
34. Folkman J, Klagsrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
35. Canalis E, Pash J, Varghese S. Skeletal growth factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993;3:155-66.
36. Dequeker J, Mohan S, Finkelman RD, et al. Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor B in cortical bone from the iliac crest: possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis. *Arth Rheum* 1993;36:1702-8.
37. Mohan S, Nakao Y, Honda Y, et al. Studies on the mechanism by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem* 1995;16:367-73.
38. Rosen CJ, Donahue LR, Hunter S. Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1994;206:83-102.
39. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology* 1995;136:124-31.
40. Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ. The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 1995;17:93S-98S.
41. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Constitutive synthesis of insulin-like growth factor-II by primary osteoblast-enriched cultures from fetal calvariae. *Endocrinology* 1992;130:1303-8.
42. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor (IGF) and bone. *Connect Tissue Res* 1989;20:277-82.
43. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122:254-60.
44. Panagakos FS. Insulin-like growth factors-I and -II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat bone. *Biochemie* 1993;75:991-4.
45. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, et al. Insulin-like growth factor-I. Supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology* 1992;131:1075-80.
46. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effect of insulin-like growth factor-I on DNA synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest* 1980;66:709-19.
47. Matsuda N, Lin VL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic Chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992;63:515-25.
48. Lian JB, Stein GS, Canalis E, et al. Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and mineralization process. In: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Lippincott W & W 1999;3:14-29.
49. Reddi AH. Bone Morphogenetic Proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cyt Growth Factor Rev* 1997;8:11-20.
50. Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering and morphogenesis of periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:154-63.
51. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 1988;81:277-81.
52. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor beta members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9843-7.
53. Joyce ME, Jingshi S, Bolander ME. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1990;21:199-209.
54. Joyce ME, Jingshi S, Scully SP, Bolander ME. Role of growth factors in fracture healing. *Prog Clin Biol Res* 1991;365:391-416.
55. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 1994;9:651-9.
56. Simmons DJ. Fracture healing perspectives. *Clin Orthop* 1985;200:100-13.
57. Triffitt JT. Initiation and enhancement of bone formation. A review [published erratum appears in *Acta Orthop Scand* 1988;59:625]. *Acta Orthop Scand* 1987;58:673-84.
58. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998;346:26-37.
59. Bostrom MPG. Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Fracture Healing. *Clin Orthop* 1998;355 Suppl:S116-23.
60. Sacchi MC. I Fattori di Crescita negli Innessi Ossei. In: Winner (ed). *Il Gel Piastrinico in Chirurgia Orale ed Implantare*. Grafica. Winner, 2000:19-21.
61. Monolagas SC, Jilka R. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling emerge insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;232:305-11.
62. Narayanan SA, Yonemura K. Purification and characterization of a novel growth factor from cementum. *J Periodont Res* 1993;28:563-5.
63. Reddi AH. Initiation of Fracture Repair by Bone Morphogenetic Proteins. *Clin Orthop* 1998;355 Suppl:S66-72.
64. Bostrom MPG, Saleh KJ, Einhorn TA. Ostein inductive Growth Factors in Preclinical Fracture in Long Bone Defects Models. *Orthop Clin North Am* 1999;30(4):647-58.
65. Urist MR, Strates BS. Bone Morphogenetic Proteins. *J Dent Res* 1971;50:1392.
66. Nanci A, Zalzal S, Fortin M, et al. Incorporation of circulating bone matrix proteins by implanted hydroxyapatite and at bone surfaces: implications for cement line formation and structuring of biomaterials. In: Davies JE (ed). *Proceedings of the International Workshop on Bone Engineering*, 2000.
67. Ripamonti U, Crooks J, Kikbride AN. Sintered porous hydroxyapatites with intrinsic osteoinductive activity: geometric induction of bone formation. *S Afr J Sci* 1999;95:335-43.