

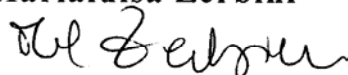
Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Mediche – Ciclo XIX

Settore scientifico disciplinare BIO/16 Anatomia Umana

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Marialuisa Zerbini



**Osteointegrazione di impianti dentari
con superfici ad elevata funzione osteogenetica**

Presentata da:

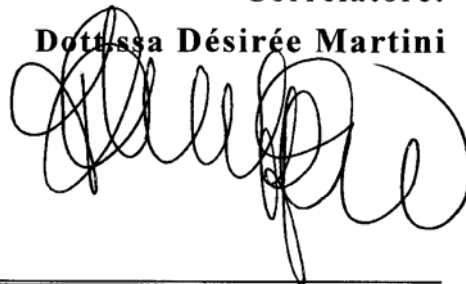
Dott.ssa Alessandra Trirè

Relatore: Chiar.mo Prof.

Alessandro Ruggeri

Correlatore:

Dott.ssa Désirée Martini



Bologna 2007

La legge n. 382 del 11/7/80 riguardante il riordinamento della docenza universitaria prevede, al I comma dell'articolo 73, che al fine del conseguimento del titolo di Dottore di Ricerca il dottorando, a conclusione del corso, debba presentare una dissertazione finale scritta illustrante i risultati di rilevante valore scientifico conseguiti durante il corso di Dottorato.

Pertanto la Dott.ssa Alessandra Trirè, laureata in Scienze Biologiche e ammessa al XIX ciclo del Dottorato di Ricerca in "Biotecnologie Mediche", presenta la seguente dissertazione nella quale vengono descritti i risultati di rilevante valore scientifico conseguiti durante il corso di Dottorato, sul tema specifico assegnatole dal Collegio dei Docenti riguardante le problematiche relative all'influenza della microtopografia superficiale di impianti in titanio sul processo di neoosteogenesi peri-implantare.

La dissertazione si compone delle parti qui di seguito elencate.

1. Biologia del tessuto osseo	Pag. 3
2. Introduzione alle problematiche inerenti l'impiego di biomateriali in ambito ortopedico e odontoiatrico	Pag. 17
3. Introduzione alle tematiche della ricerca	Pag. 32
4. Scopo e finalità della ricerca	Pag. 41
5. Tecniche, materiali e metodi impiegati nella ricerca	Pag. 43
6. Risultati	Pag. 52
7. Discussione	Pag. 60
8. Riferimenti bibliografici	Pag. 67
9. Iconografia	Pag. 78

BIOLOGIA DEL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato caratterizzato da una matrice extracellulare (ECM) calcificata che gli conferisce durezza e resistenza meccanica.

Per quel che riguarda la sua struttura, come evidente a livello microscopico, il tessuto osseo risulta essere un tessuto molto ben organizzato in cui una fase minerale impregna fibrille collagene disposte secondo linee preferenziali di forza in modo tale da conferire proprietà di resistenza alle sollecitazioni meccaniche. Si distinguono due tipi di tessuto osseo: (1) a fibre intrecciate e (2) lamellare. Il primo è considerato osso immaturo e si rinviene normalmente nell'embrione, nei neonati e in certe regioni metafisarie dello scheletro in crescita, mentre il secondo rappresenta l'osso maturo che deriva dal rimodellamento del tessuto osseo a fibre intrecciate o di osso preesistente.

Il **tessuto osseo a fibre intrecciate** non presenta un orientamento uniforme delle fibre collagene, ha un maggior numero di cellule per unità di volume rispetto a quello lamellare e una disposizione pressoché casuale delle sue componenti cellulare e minerale. Esso contiene cristalli di idrossiapatite (HA) relativamente piccoli e la mancanza di un orientamento preferenziale delle fibre collagene gli conferisce caratteristiche isotrope e buona resistenza allo stress da sollecitazioni meccaniche applicate.

Il **tessuto osseo lamellare** è invece una varietà di tessuto più organizzato, con un orientamento ordinato e parallelo delle fibrille collagene; la conseguente anisotropia fa sì che tale tessuto esibisca un comportamento meccanico differente a seconda della direzione delle forze applicate.

Il tessuto osseo lamellare si presenta in due forme architetture diverse, entrambe rilevabili in tutte le ossa, anche se in proporzioni differenti: il tessuto osseo compatto, che costituisce il rivestimento esterno di tutte le ossa e la diafisi delle ossa lunghe, conferisce rigidità, durezza e resistenza alle sollecitazioni meccaniche; il tessuto osseo spugnoso, che si trova prevalentemente a livello di ossa brevi e corte e nelle epifisi delle lunghe, conferisce all'osso leggerezza grazie alla sua struttura alveolare. Questa diversificazione consente di ottimizzare peso e ingombro sterico in funzione delle diverse sollecitazioni cui ciascun distretto è sottoposto.

Il **tessuto osseo compatto** è caratterizzato da una ECM fortemente mineralizzata a struttura lamellare ordinata, percorsa da canali di Havers disposti parallelamente all'asse maggiore dell'osso e contenenti vasi e fibre mieliniche; l'innervazione e la vascolarizzazione provenienti da periostio e cavità midollare sono garantite dalla presenza di un altro sistema di canali, i canali di Volkmann, disposti perpendicolarmente ai primi. L'unità funzionale caratteristica del tessuto prende il nome di *osteone* ed è composta da

otto-venti lamelle di tessuto osseo di circa 5 μm di spessore, disposte concentricamente attorno al canale di Havers. All'interno di questo sistema di lamelle concentriche sono presenti delle lacune lenticolari nelle quali trovano alloggio gli osteociti. Tali cellule, seppure imprigionate nella matrice extracellulare, riescono a comunicare attraverso una fitta rete di canalicoli che consentono scambi nutrizionali e metabolici e la partecipazione delle cellule stesse alla regolazione dell'omeostasi calcica. Gli spazi presenti tra tre o più osteoni contigui sono occupati da lamelle ossee disposte in modo più irregolare (*sistema di lamelle interstiziali*), mentre alla periferia dell'osso sono presenti sistemi di lamelle parallele e disposte tangenzialmente alle superfici ossee interna ed esterna (rispettivamente *sistemi circolari interno ed esterno*); questo disegno architettonico conferisce resistenza non solo a forze compressive ma anche a sollecitazioni tensionali e torsionali.

Il **tessuto osseo spugnoso** presenta invece una struttura caratterizzata da trabecole ossee variamente intersecate tra loro e delimitanti cavità midollari che *in vivo* contengono tessuto mieloide emopoietico. Le trabecole presentano pochi sistemi haversiani incompleti e hanno ridotte dimensioni trasversali, pertanto le cellule comunicano direttamente con le cavità midollari tramite i loro processi citoplasmatici. Le fibrille collagene formano una rete tridimensionale orientata lungo le linee di stress, che conferisce particolare resistenza a forze compressive.

L'osso è rivestito da tessuto connettivo denso che sul versante esterno prende il nome di periostio mentre sul versante interno è denominato endostio.

Il tessuto osseo si forma a partire da tessuto connettivo mesenchimale. Per il suo sviluppo sono necessari elementi cellulari con funzione osteoprogenitrice ed un ambiente idoneo alla formazione di matrice ossea e alla sua mineralizzazione. In condizioni normali il tessuto osseo si forma solo se è presente una vascolarizzazione adeguata che attraverso una fitta rete di capillari permetta di fornire al tessuto sostanze nutritive, sali ed ossigeno. Le cellule osteoprogenitrici, che possono essere già presenti come cellule mesenchimali indifferenziate oppure possono venire reclutate dalla rete capillare, sono indotte a differenziarsi e a produrre fibrille collagene e sostanza fondamentale, la quale solo in una fase successiva andrà incontro a mineralizzazione. Secondo uno schema ormai universalmente accettato, lo sviluppo del tessuto osseo può avvenire attraverso un meccanismo diretto detto anche ossificazione intramembranosa oppure attraverso una modalità indiretta detta ossificazione intracartilaginea o encondrale, che prevede la

formazione di un provvisorio abbozzo cartilagineo destinato ad essere successivamente sostituito da tessuto osseo.

L'**ossificazione intramembranosa** o **diretta** coinvolge cellule mesenchimali già orientate verso la linea evolutiva osteoprogenitrice e prevede la diretta formazione di tessuto osseo localmente, senza che ci sia un modello cartilagineo preesistente; ne sono un esempio molte ossa piatte.

L'**ossificazione encondrale** o **indiretta** necessita della presenza di un modello cartilagineo preformato, che in un secondo tempo viene gradatamente rimosso e sostituito da tessuto osseo. Il vantaggio di questa seconda modalità consiste nel fatto che fino a quando rimangono aree di tessuto cartilagineo all'interno dell'osso neoformato, quest'ultimo sarà in grado di crescere e svilupparsi. L'ossificazione indiretta prevede il differenziamento di cellule mesenchimali in condroblasti e di questi in condrociti, con sintesi di una matrice extracellulare caratterizzata da collagene di tipo II e ricca in proteoglicani. La matrice viene poi modificata per mezzo di enzimi elaborati dai condrociti divenuti ipertrofici, secondo uno schema che porta alla formazione di un ambiente favorente la deposizione di calcio. Una volta che la matrice è stata mineralizzata, essa viene invasa da gittate vascolari e come risultato della risposta angiogenica sopraggiungono da una parte i condroclasti, che degradano la cartilagine calcificata, e dall'altra i precursori degli osteoblasti, che costituiranno il fronte di deposizione del tessuto osseo.

Nonostante i due modelli di ossificazione siano così diversi, il meccanismo vero e proprio di formazione del tessuto osseo non presenta sostanziali differenze nei due casi: per entrambi il momento fondamentale consiste nella deposizione da parte degli osteoblasti di sali inorganici su una matrice collagenica.

Il tessuto osseo non è un tessuto statico, ma come già detto va incontro a continui processi di rimodellamento che ne modificano la struttura a seconda delle diverse richieste funzionali. A questo riguardo, nell'osso adulto si riscontra un'intensa attività sia anabolica che catabolica, riconducibile a quattro tipi di fenomeni indicati come: riassorbimento osseo precoce, crescita in lunghezza e in spessore, conversione da osso spugnoso a compatto e rimodellamento dell'osso compatto.

Il riassorbimento osseo precoce avviene a carico delle spicole primitive per opera degli osteoclasti e in presenza di una abbondante componente vascolare. Lo scopo di questo primo fenomeno è quello di creare spazio per la formazione di nuovo osso.

La crescita in lunghezza ed in spessore si verifica per la continua proliferazione dei condrociti all'interno dei nuclei di ossificazione e nei piatti epifisali. Nella crescita in spessore, in particolare, l'osso si forma per deposizione sottoperiosteale con un processo di ossificazione intramembranosa. Contemporaneamente dell'osso viene riassorbito dagli osteoclasti a livello dell'endostio, mantenendo così in questa dinamica dimensioni adeguate alla cavità midollare.

Durante la conversione dell'osso spugnoso in compatto si assiste ad una graduale trasformazione delle primitive trabecole ossee in osso lamellare, e la superficie delle cavità dell'osso spugnoso viene progressivamente invasa da canali ossei percorsi longitudinalmente da vasi: questa struttura ricorda quella di un sistema haversiano primitivo. L'intensa attività osteoclastica scava quindi all'interno di questo osso dei grossi canali detti *tunnel di erosione*, che una volta raggiunto un certo diametro vengono invasi da cellule osteoprogenitrici. Tali cellule dopo essersi differenziate in osteoblasti danno inizio alla produzione di matrice e alla formazione di osso compatto, ovvero una struttura osteonica.

Un rimodellamento dell'osso compatto si rende continuamente necessario in risposta agli stimoli di natura meccanica che agiscono sul segmento osseo; questo avviene secondo un procedimento del tutto analogo a quanto già descritto: cellule uninucleate veicolate da vasi erodono l'osso compatto e distruggono interamente od in parte i vecchi sistemi haversiani permettendo successivamente deposizione e crescita di nuovi osteoni. Le lamelle esterne ed interne di osso compatto sono rimosse dal periostio e dall'endostio, in una continua alternanza che stabilisce l'architettura definitiva del segmento osseo.

La capacità di rimodellamento in funzione di stimoli provenienti tanto dall'organismo quanto dall'esterno rende il tessuto osseo plastico e dinamico, in grado sia di esercitare una stretta correlazione tra funzione e struttura sia di svolgere un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi minerale.

In accordo con il modello proposto da Parfitt [1], è possibile schematizzare il processo di rimodellamento osseo in una sequenza di fasi:

1) *quiescenza*: la superficie dell'osso quiescente è ricoperta da un sottile strato di cellule appiattite, le lining cells, che derivano da terminale trasformazione degli osteoblasti; tra queste cellule e l'osso è interposto uno strato di tessuto osteoide. Le lining cells hanno recettori per una vasta gamma di sostanze che possono funzionare da stimolo per avviare l'assorbimento osseo e in risposta a tali stimoli dirigono il riassorbimento dello strato

superficiale di tessuto osteoide che ricopre l'osso; in questo modo l'osso mineralizzato si trova esposto alla fase successiva [2,3].

2) *attivazione*: comincia con il reclutamento chemiotattico di precursori degli osteoclasti che giungono al sito di attivazione per via ematica attraverso i canali di Havers e Volkmann, seguito da un loro attacco alla superficie ossea; il processo di adesione è mediato da proteine di adesione contenenti sequenze RDG (quali osteopontina, osteonectina, osteocalcina).

3) *riassorbimento*: l'osteoclasta è una cellula molto mobile che può riassorbire osso per un'area pari a due-tre volte l'area con la quale è in contatto.

4) *inversione*: questa fase costituisce un intervallo di tempo tra il completamento del riassorbimento e l'inizio della formazione ossea. Gli osteoblasti vengono attirati alla base della lacuna di riassorbimento da stimoli di natura chemiotattica, seguono poi adesione, proliferazione e differenziamento che avvengono in modo graduale e concertato e portano infine alla formazione di nuovo tessuto osseo. Contemporaneamente si osserva la comparsa di fagociti mononucleati che sembra abbiano il ruolo di attenuare la rugosità superficiale lasciata dai processi di riassorbimento e vengono rilasciate proteine di matrice che sono importanti nel coordinare le attività osteoclastica e osteoblastica.

5) *formazione*: è un processo suddivisibile in due fasi, poichè dapprima viene sintetizzato e deposto tessuto osteoide presso siti specifici, poi gli osteoblasti ne dirigono la mineralizzazione.

Nel tessuto osseo è possibile individuare una componente cellulare e una ECM.

La **componente cellulare** è costituita da cinque differenti tipi cellulari: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti, lining cells, osteoclasti. I primi quattro tipi di cellule appartengono ad una stessa linea cellulare evolutiva, lungo la quale esiste un gradiente di differenziamento che diviene pienamente espresso quando la cellula osteoprogenitrice raggiunge la superficie ossea.

Le **cellule osteoprogenitrici** sono di derivazione mesenchimale e costituiscono una popolazione di elementi indifferenziati ma già orientati verso la linea evolutiva delle cellule ossee. Sono di solito allineate in uno – due strati vicino al fronte di deposizione. Sono cellule allungate, fusiformi, con un notevole contenuto in glicogeno. Si caratterizzano per la spiccata attività mitotica e durante l'accrescimento dell'osso proliferano attivamente trasformandosi in osteoblasti.

Gli **osteoblasti** sono responsabili della produzione e deposizione della componente organica della ECM (tessuto osteoide) e della regolazione dei processi di

mineralizzazione a suo carico, ma si ritiene svolgano anche un ruolo nelle fasi iniziali del processo di riassorbimento mediante l'elaborazione di proteasi neutre che rimuovono dalla superficie l'osteoido preparando la struttura all'intervento degli osteoclasti. Sono cellule globose che possiedono caratteristiche citologiche tipiche di cellule in intensa attività biosintetica e secretoria, in particolare presentano un voluminoso nucleo con prominenti nucleoli, un ben sviluppato apparato di Golgi e un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso polarizzato. Il loro prodotto principale è il collagene di tipo I, che viene assemblato in fibrille negli spazi extracellulari. La secrezione è in genere polarizzata verso la superficie ossea, come testimoniato dall'eccentricità del nucleo, a dimostrare che le cellule secernono enormi quantità di osteoido verso il fronte di mineralizzazione, ma ad intervalli regolari secernono anche nelle altre direzioni; in questo modo esse rimangono imprigionate nella matrice in via di mineralizzazione e, una volta terminata la fase secretoria, l'osteoblasto "murato" diventa osteocita. Gli osteoblasti sono particolarmente numerosi in corrispondenza delle superfici ossee e nello strato osteogenetico di periostio ed endostio, in particolare durante la morfogenesi dell'osso; il loro numero e stato di attività possono variare nell'adulto in risposta a stimoli esterni che richiedano la deposizione di nuovo tessuto osseo, riassorbimento incluso, e giocano un ruolo chiave nella regolazione del turnover dell'osso.

Gli **osteociti** si trovano all'interno della matrice ossea mineralizzata della quale si erano circondati, in qualità di osteoblasti, durante la fase di formazione dell'osso. La loro attività metabolica è assicurata dai lunghi processi citoplasmatici che percorrono la matrice mineralizzata all'interno di sottili canalicoli e che garantiscono la comunicazione con vasi, liquidi interstiziali e cellule adiacenti; si ritiene che potrebbero agire da meccanocettori e, attraverso questa fitta rete comunicativa, monitorare continuamente l'ambiente circostante e trasmettere gli stimoli raccolti ad altre cellule, in particolare agli osteoblasti. Questi processi cellulari ospitati entro i canalicoli sono collegati tra loro per mezzo di gap junctions, che consentono rapidi flussi di calcio coinvolti nella trasmissione di informazioni tra gli osteoblasti sulla superficie dell'osso e gli osteociti all'interno della struttura.

Gli osteociti contenuti nelle lacune possono assumere funzioni diverse secondo necessità, modificando opportunamente la propria struttura. La linea cellulare può essere identificata attraverso l'espressione di specifici antigeni di superficie e la marcatura di determinati elaborati, come l'attività della fosfatasi alcalina quando la cellula è in attiva fase secretoria e la perdita di tale attività enzimatica quando la cellula evolve a osteocita.

Queste cellule sono quindi in grado di deporre nuovo tessuto osteoide all'interno della lacuna o di demolirlo, partecipando così alla regolazione dell'omeostasi calcica. Nella fase di deposizione di matrice gli osteociti presentano caratteristiche citologiche simili a quelle degli osteoblasti, mentre nella fase di quiescenza si presentano ricchi di lisosomi e hanno l'aspetto di cellule fagocitanti.

Le lining cells si trovano a contatto con la superficie dell'osso e appaiono come cellule sottili, allungate ed appiattite, che possiedono pochi organelli citoplasmatici ed hanno l'aspetto di cellule quiescenti disposte a coprire la superficie ossea, dove non si osservano aree di neoformazione o riassorbimento ma è presente una situazione di relativa quiescenza. Sul ruolo di queste cellule vi sono pareri discordanti: secondo alcuni autori fungerebbero da barriera selettiva tra osso e compartimenti fluidi extracellulari e contribuirebbero all'omeostasi minerale regolando i flussi di calcio e fosforo, secondo altri sarebbero da interpretare come regolatori della crescita dei cristalli della fase minerale dell'osso.

Gli **osteoclasti** sono grandi cellule polinucleate appartenenti alla linea cellulare dei monociti-macrofagi. Hanno la funzione di riassorbire l'osso mineralizzato e la cartilagine, rappresentando il fronte di erosione; tale capacità è strettamente dipendente dal contatto col substrato osseo. Quando osservati in sezioni istologiche, si può notare che nell'osso trabecolare gli osteoclasti si ritrovano localizzati nelle *lacune di Howship* a livello della superficie ossea sottoposta ad attivo rimodellamento, mentre nell'osso corticale sono all'apice dei cosiddetti *cutting cones*, strutture coniche costituite da un osteoclasta che procede nello spessore dell'osso riassorbendolo e scavando un tunnel che in sezione trasversale appare come una cavità. In questo percorso la cellula è seguita da vicino da un capillare e da un gruppo di cellule endoteliali e mesenchimali perivascolari, che possono successivamente differenziarsi in osteoblasti destinati a deporre tessuto osteoide e a riempire la cavità di riassorbimento. Gli osteoclasti, una volta adesi alla zona deputata al rimodellamento, polarizzano tutto il proprio apparato citologico verso l'interfaccia cellula-osso e danno origine al fronte di erosione; a fase di erosione completata vengono rimpiazzati da cellule mononucleate che a loro volta precedono gli osteoblasti. Gli osteoclasti sono ricchi di enzimi lisosomiali, anch'essi a collocazione polarizzata, tra cui la *fosfatasi acida tartrato resistente* (TRAP) che è un marker tipico di queste cellule e un'*anidrasi carbonica* importante nel processo di riassorbimento; nella zona rivolta verso il fronte di erosione si osservano anche larghi vacuoli costituiti da lisosomi primari e secondari. Sia la TRAP che altri enzimi lisosomiali, tutti peraltro a collocazione

intracellulare polarizzata, vengono secreti nel microambiente interfacciale interessato dal riassorbimento. Tali cellule presentano una membrana asimmetrica polarizzata che nel momento in cui la cellula è in stretto contatto con il substrato osseo appare caratterizzata da convolute estroflessioni e digitazioni che le conferiscono un aspetto “ruffled”. Si presume che queste formazioni derivino da vescicole intracellulari portanti pompe protoniche, che si inseriscono nella membrana attraverso un processo simile ad un’esocitosi. Gli osteoclasti contengono anche un imponente citoscheletro i cui microtubuli sembrano giocare un ruolo centrale nel processo di polarizzazione, guidando le vescicole contenenti le pompe protoniche verso il versante membranoso di riassorbimento. L’intima adesione cellula-osso, requisito essenziale perché si verifichi riassorbimento, si riflette a livello del versante ruffled nell’esistenza di una zona “chiara” priva di organuli e ricca di microfilamenti orientati perpendicolarmente alla superficie ossea, caratteristica questa tipica di tutte le cellule della linea macrofagica nel momento in cui aderiscono ad un substrato. Il primo passo nel meccanismo di riassorbimento osseo è l’adesione degli osteoclasti alla matrice e di conseguenza la creazione di una membrana a polarità funzionale. Questi eventi coinvolgono interazioni tra recettori di membrana e proteine della matrice ossea contenenti sequenze RGD; l’adesione genera segnali intracellulari che vengono tradotti in modificazioni a livello del citoplasma e soprattutto della membrana, la quale nella porzione rivolta verso il substrato osseo assumerà un aspetto ruffled per la presenza di pompe protoniche e risulterà delimitare un microambiente extracellulare di riassorbimento isolato. In questo microambiente si verifica la dissoluzione della fase inorganica, seguita da quella organica, come conseguenza di una acidificazione dell’ambiente prodotta dalle pompe protoniche sulla membrana ruffled: una tale localizzata acidificazione permette anche la successiva solubilizzazione della fase organica dell’osso. I prodotti di degradazione sono poi captati da vacuoli digestivi e lisosomi secondari e infine rilasciati negli spazi vascolari circostanti la cellula; in particolare il calcio liberato, che rimane confinato nello spazio fra cellule e osso, attraverso un meccanismo non del tutto chiarito ma che probabilmente prevede l’intervento di canali del calcio presenti nella membrana dell’osteoclasta, attraversa la cellula e viene riversato negli spazi extracellulari in prossimità delle lacune vascolari. Gli osteoclasti si attivano solo dopo distruzione dello strato di osteoide che ricopre la superficie ossea, un effetto questo mediato dagli osteoblasti dello strato di rivestimento; l’esposizione della sottostante matrice mineralizzata è dunque causata da degradazione dell’osteoide per mezzo di proteasi neutre elaborate dagli osteoblasti superficiali. In tal

modo gli osteoclasti, guadagnato l'accesso alla matrice mineralizzata, iniziano il processo di degradazione, che porta tra l'altro all'attivazione di specifiche molecole quiescenti come la BMP; queste molecole segnale rilasciate, che hanno molteplici proprietà mitogeniche, chemiotattiche e di stimolo alla differenziazione, risultano estremamente importanti nella modulazione degli eventi cellulari e nella regolazione dell'omeostasi, mantenendo in equilibrio funzionale la relazione neodeposizione/riassorbimento.

La **matrice extracellulare (ECM)** consta di una componente organica e di una inorganica.

Nella **fase organica** si possono individuare due gruppi di prodotti: collagene e proteine non collageniche. E' importante innanzitutto sottolineare che molte delle proteine sintetizzate dalle cellule del tessuto osseo non sono esclusive di questo tessuto ma sono prodotte anche da altri tipi cellulari e infatti si ritiene che siano molto poche le proteine veramente specifiche del tessuto osseo. Tuttavia le proteine che si rinvencono nell'osso dimostrano differenze di natura chimica rispetto a quelle di altri tessuti, differenze dovute a splicing alternativo dell'mRNA e a diverse modificazioni post-traslazionali quali glicosilazione, fosforilazione e solfatazione. Le proteine della matrice ossea giocano un ruolo strutturale nel fornire un'impalcatura e siti di legame per la regolazione della deposizione della fase minerale e per il suo turnover, ma hanno anche un ruolo funzionale nel modulare l'attività cellulare, attraverso interazioni cellula/matrice; molte di queste proteine di matrice contengono delle sequenze Arg-Gly-Asp, dette *sequenze RGD*, che sono caratteristiche di proteine di adesione; tali sequenze vengono riconosciute da proteine integrali di membrana, le integrine, che determinano un legame tra ECM e citoscheletro cellulare e quindi mediano ancoraggio e adesione delle cellule. Inoltre rappresentano i prodotti dell'attività di secrezione di cellule osteoblastiche e pertanto sono markers biochimici dei processi di formazione (nella loro forma intatta o di precursori) e di riassorbimento (nella loro forma degradata). Queste proteine vengono sintetizzate da osteoblasti in diversi stadi funzionali; inoltre anche gli osteoclasti sono in grado di secernere delle proteine che poi vengono incorporate nella matrice mineralizzata.

Il **collagene** è una proteina ubiquitaria a solubilità estremamente bassa e rappresenta la principale proteina della ECM, costituendo circa il 90% della fase organica. Ha una fondamentale funzione strutturale fornendo uno scaffold per l'organizzazione della fase minerale e presenta inoltre una funzione meccanica offrendo al tessuto resistenza tensile alle sollecitazioni. Un'altra funzione è quella di fornire un sito di ancoraggio per proteine non collageniche, che sono in parte legate a specifici domini della molecola di collagene o

per mezzo di legami covalenti o per mezzo di altre associazioni più deboli. Il collagene dell'osso sintetizzato dagli osteoblasti è di tipo I e risulta costituito da due catene $\alpha 1$ legate ad una catena $\alpha 2$ a formare una tripla elica; ciascuna di queste strutture microfibrillari si lega alle altre circostanti a formare una struttura di ordine superiore, la *fibrilla*, in cui le microfibrille si susseguono longitudinalmente distanziate di 40 nm. In direzione trasversale fibrille contigue risultano allineate ma sfalsate di un quarto della loro lunghezza, facendo sì che al microscopio elettronico la fibrilla appaia striata con una periodicità tipica di 67 nm in cui si alternano una zona scura corrispondente alla regione vuota tra due fibrille (gap zone) e una zona chiara di sovrapposizione (overlap zone). Le fibrille collagene sono poi immerse in una sostanza organica amorfa composta prevalentemente da glicoproteine e proteoglicani acidi, la cui concentrazione decresce al procedere del processo di calcificazione.

Le **proteine non collageniche** presenti nella matrice possono essere suddivise in diverse classi di macromolecole.

- **proteoglicani**, composti da glicosaminoglicani acidi solitamente solforati, uniti assieme da brevi catene proteiche. I principali proteoglicani presenti sono:

biglicano, costituito da due molecole di condroitinsolfato unite ad una estremità da un polipeptide ricco in leucina, che si ritrova sia nella ECM mineralizzata sia nell'osteoido;
decorina, associata alle microfibrille di collagene e caratterizzata da una sola molecola di condroitinsolfato, che si rinviene solo nella ECM mineralizzata per cui si ipotizza che abbia un ruolo nell'orientare la deposizione dei cristalli minerali lungo le microfibrille collageniche;

piccoli proteoglicani specifici concentrati lungo il fronte di mineralizzazione dove il core proteico viene degradato lasciando le catene di condroitinsolfato imprigionate nella fase mineralizzata, che contribuiscono a rendere l'impacchettamento del collagene più denso.

- **glicoproteine**, solitamente fosforilate o solfatate, comprendenti diverse molecole tra cui:

fosfatasi alcalina, un enzima ad attività idrolasica (che si esplica in ambiente alcalino), necessario per avviare la mineralizzazione - come dimostrato dalla sua abbondanza nelle matrix vesicles - e dotato, inoltre, della capacità di trasferire residui fosforilati su numerose altre proteine di matrice. Esso viene prodotto dalle cellule della linea osteoblastica nel passaggio dalla fase G2 alla fase M del ciclo cellulare localizzandosi sul versante esterno della membrana cellulare ed è uno dei principali markers degli osteoblasti: inizialmente le cellule sono preosteoblasti appiattiti e fusiformi, poi col

proseguire dell'osteogenesi quelle più prossime ai vasi assumono la morfologia di osteoblasti fosfatasi-positivi e infine, con la completa maturazione a osteociti esse perdono l'attività enzimatica;

osteonectina, una fosfoproteina sintetizzata da fibroblasti, osteoblasti e in generale da tipi cellulari coinvolti nel trasporto di ioni. Essa è in grado di legare ioni calcio e fosforo regolando così la deposizione minerale e l'interazione cellula-matrice ma è anche un efficiente inibitore della formazione di idrossiapatite in soluzione. Si tratta infatti di una molecola ad azione dose-dipendente che in bassa concentrazione agisce come nucleatore concentrando il calcio nelle sue adiacenze e creando pertanto le condizioni per avviare la precipitazione del fosfato di calcio mentre ad alte dosi si lega direttamente ad una o più facce dei cristalli bloccandone l'ulteriore accrescimento;

fibronectina, una molecola di adesione localizzata prevalentemente nella matrice pericellulare e caratterizzata dalla capacità di legare il collagene; si ritiene che sia coinvolta nei processi di migrazione, adesione alla matrice e organizzazione delle cellule dell'osso.

- **bone sialoproteins (BSPs)**, glicoproteine contenenti residui di acido sialico, in grado di legarsi fortemente all'idrossiapatite mediando l'ancoraggio tra cellule e matrice mineralizzata.

- **GLA proteins**, proteine leganti catene di glicosaminoglicani e contenenti residui di acido γ -carbossiglutammico (GLA) carichi negativamente, pertanto in grado di agire da chelanti di cationi bivalenti quali gli ioni calcio. Le GLA proteins possono essere distinte in:

osteocalcina, una piccola proteina contenente da tre a cinque residui di GLA, che si ipotizza abbia un ruolo di inibizione della mineralizzazione in quanto è in grado di chelare lo ione calcio rendendolo indisponibile per lo ione fosfato e nello stesso tempo potrebbe agire da specifico regolatore di forma e dimensioni dei cristalli di idrossiapatite. Viene sintetizzata nel tessuto osseo maturo in fase di differenziamento avanzato ed è invece scarsa nel tessuto in via di formazione;

matrix GLA proteins, proteine presenti nelle prime fasi dello sviluppo del tessuto, quando il livello di osteocalcina è ancora basso, osservabili anche nella cartilagine destinata ad essere sostituita da tessuto osseo.

- **bone morphogenetic protein (BMP)**, un pool di proteine rilasciate durante i processi di riassorbimento osseo con importanti effetti regolatori su differenziamento, attivazione, crescita e turnover cellulare.

La **fase inorganica** risulta costituita principalmente da *idrossiapatite* sotto forma di cristalli distribuiti in maniera orientata su uno scaffold di fibrille collagene. La precipitazione di calcio e fosfato dalla soluzione può produrre una notevole varietà di fasi, a seconda del pH, del rapporto molare Ca/P e del grado di saturazione della soluzione. In effetti sono stati identificati anche altri composti quali bruscite, β -tricalciofosfato e ottacalciofosfato, ma solo come forme intermedie o in calcificazioni patologiche. La struttura ideale dell'idrossiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, è quella che più comunemente si trova in natura, tuttavia si possono avere delle sostituzioni nel suo reticolo esacristallino sia a carico degli ioni Ca^{2+} che degli OH^- , per cui una formula generale che comprenda tutte le possibili sostituzioni è la seguente, in cui la "x" può assumere valori compresi tra zero e due: $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$.

Le apatiti biologiche non stechiometriche che si rinvencono come componenti principali della fase inorganica dell'osso hanno proprietà differenti da quelle delle idrossiapatiti pure, a causa delle sostituzioni di alcuni ioni all'interno del reticolo cristallino che ne fanno variare i parametri strutturali e ne condizionano quindi alcune caratteristiche quali la cinetica di dissoluzione e le dimensioni.

I meccanismi che portano alla formazione dell'idrossiapatite non sono stati ancora del tutto chiariti. Si suppone che numerosi fattori umorali cellulari ed extracellulari siano essenziali per una fisiologica mineralizzazione di matrice: un appropriato scaffold collagenico, la presenza di ioni calcio e fosforo, un ambiente basico al quale contribuiscono proteine di matrice anioniche, molecole e macromolecole di matrice, fattori di crescita, enzimi e cellule. Attualmente si ritiene che la mineralizzazione della matrice avvenga in due fasi: la prima consiste nella formazione di piccoli nuclei mineralizzati che si generano per nucleazione eterogenea su una fase-substrato, mentre la seconda controlla l'accrescimento dei nuclei stessi. La prima fase è regolata essenzialmente dagli osteoblasti, che stimolano il processo di calcificazione: questo ruolo viene esercitato principalmente attraverso il controllo e l'intermediazione del trasporto di ioni calcio dai vasi alla matrice, con attività cellulari che prevedono il coinvolgimento dei mitocondri. Da queste cellule si generano delle vescicole delimitate da membrana chiamate *matrix vesicles*, che sono ritenute i siti iniziali di calcificazione; esse contengono glicoproteine e proteolipidi transmembrana che funzionano da pompe ioniche permettendo l'accumulo di ioni calcio e fosfato, nonché enzimi associati col processo di mineralizzazione come la fosfatasi alcalina. Le *matrix vesicles* si rinvencono in sede extracellulare e, poiché al loro interno sono stati riscontrati dei microcristalli aghiformi, è

stata formulata l'ipotesi che possano fungere da primi siti di nucleazione cristallina. Le matrix vesicles rappresenterebbero dunque un ambiente protetto e stabile per la formazione dei primi cristalli e fornirebbero inoltre il supporto enzimatico necessario per la successiva proliferazione dei cristalli nell'ambiente esterno. La deposizione di sali minerali iniziata a livello delle matrix vesicles si propaga in seguito nella matrice circostante; in questa fase si assiste all'accrescimento dei nuclei iniziali fino alla formazione, negli spazi interfibrillari, di strutture cristalline aghiformi di apatite biologica la cui crescita risulta associata alla presenza di strutture filamentose organiche denominate *crystal ghosts*, di probabile natura proteico-polisaccaridica. Queste sostanze hanno un ampio spettro di azioni: possono alterare la nucleazione e la successiva crescita dei cristalli in vario modo in maniera dose-dipendente, agendo da nucleatori in basse concentrazioni e da regolatori della crescita in alte concentrazioni; possono concorrere a formare un ambiente protetto intorno ai nuclei di cristallizzazione stabilizzandoli e prevenendone un'ulteriore crescita; possono legare ioni calcio e fosforo fungendo così da nucleatori epitassiali e quindi fornendo una superficie per l'avvio del processo di nucleazione, in grado di conferire agli ioni la stessa configurazione spaziale dei cristalli di idrossiapatite; possono legarsi a una o più facce del cristallo in crescita e bloccarne l'ulteriore sviluppo; possono legarsi ad altre proteine cambiando conformazione e proprietà di azione sui cristalli di nucleazione; possono legarsi ad elementi cellulari determinando variazioni nella concentrazione extracellulare di Ca/P e nel pH. In conseguenza di questa associazione si formano dunque aggregati cristallini aghiformi disposti radialmente intorno ad un nucleo centrale, che risultano più abbondanti laddove è presente una maggior quantità di substrato organico della matrice. Successivamente si assiste alla deposizione di minerale anche all'interno delle fibrille collagene, prevalentemente nelle gap zones, in cui sono localizzate sostanze come BSP che si comportano da chelanti del calcio. Il prevalere della calcificazione inter- o intrafibrillare sembra essere correlato alla quantità di substrato proteico disponibile: in tessuti con elevato contenuto proteico come l'osso midollare predominano le strutture aghiformi cristalline mentre in distretti con fibrille collagene compatte come l'osso corticale la fase minerale è confinata all'interno delle fibrille, dove assume un aspetto granulare amorfo. Con il procedere della calcificazione, le fibrille si aggregano lateralmente divenendo molto compatte e questa compattazione porta ad una ridisposizione anche dei filamenti cristallini interfibrillari, che passano da una disposizione a noduli radiali tipica delle prime fasi di calcificazione ad un orientamento parallelo all'asse delle fibrille collagene.

**INTRODUZIONE ALLE PROBLEMATICHE INERENTI
L'IMPIEGO DI BIOMATERIALI IN AMBITO ORTOPEDICO E
ODONTOIATRICO**

Prima di entrare nel merito di questa dissertazione è opportuno fornire definizioni appropriate relative alla terminologia utilizzata e al contesto in cui questo lavoro si sviluppa.

Si definisce **biomateriale**, in accordo con gli atti del VI Simposio annuale internazionale sui Biomateriali del 1974, una “sostanza sistematicamente e farmacologicamente inerte, designata per l’impianto all’interno di tessuti viventi o per l’incorporazione con essi” [4]. Il suffisso “bio” non significa che si tratti di materiale vivente o comunque di origine biologica ma si riferisce, in modo peraltro improprio, alla sua destinazione, che è l’incorporazione in tessuti viventi. Di fatto la definizione di biomateriale precedentemente riportata esclude che si tratti di tessuto vivente, per il quale si parla di trapianto e non di impianto.

Da un punto di vista genetico ed immunologico, l’inserimento in un organismo ospite di materiali che possano sostituire parti di osso mancanti o stimolare/indurre la formazione di nuovo osso può essere classificato come segue [5]:

- **innesto autologo**, in cui il tessuto utilizzato proviene dallo stesso individuo che riceve il trapianto: si tratta quindi di un semplice trasferimento tra due regioni dello stesso organismo;
- **impianto omologo** o **allogenico**, dove il donatore appartiene alla stessa specie del ricevente, senza alcun vincolo di relazione genetica tra i due;
- **impianto eterologo** o **xenogenico**, in cui il donatore appartiene ad una specie diversa da quella del ricevente;
- **impianto alloplastico**, dove il materiale da impianto è di origine sintetica.

L’effetto prodotto da un impianto o da un innesto in termini di crescita di nuovo osso può essere definito secondo le seguenti categorie: osteoinduzione, osteoconduzione, risposta osteofilica e osteostimolazione.

Si parla di **osteoinduzione**, o stimolazione osteogenetica, quando un materiale ha in sé la capacità di suscitare la formazione di osso anche in un tessuto ospite non osseo. I materiali osteoinduttori sono sfruttati principalmente per curare larghi difetti ossei o per riprodurre osso laddove normalmente non ci sarebbe stata una riparazione spontanea. Nella deposizione spontanea di nuovo osso da parte dell’organismo l’azione osteoinduttiva viene esercitata dalla matrice ossea, corticale o midollare, la quale ha la capacità di stimolare il midollo osseo in senso osteogenetico.

Nella **osteoconduzione** il materiale impiantato riesce a stimolare l'osteogenesi solo se inserito in diretto contatto con tessuto osseo.

Si parla di **risposta osteofilica** quando il nuovo osso ha la tendenza a crescere lungo la superficie del materiale impiantato. Molti materiali sintetici, come ad esempio i biovetri, pur non avendo alcun potere osteoinduttivo possiedono tuttavia capacità osteofilica, probabilmente dovuta ad un'affinità tra la superficie del materiale impiantato e gli osteoblasti o preosteoblasti che andranno a deporre la matrice ossea.

Nella **stimolazione ossea morfogenetica** il materiale possiede sia capacità osteofile che osteoinduttive, stimolando quindi la crescita di tessuto osseo sia direttamente che tramite la liberazione di fattori in grado di indurre la neoformazione di osso anche a distanza.

Il successo di un impianto è strettamente legato al grado di tolleranza reciproca che si instaura tra l'impianto stesso e l'organismo. A questa condizione si dà il nome di **biocompatibilità**. In altri termini un impianto si dice biocompatibile se, una volta inserito nel tessuto ospite, non vi induce effetti avversi significativi e nemmeno ne subisce [6].

La biocompatibilità di un impianto può essere valutata sotto diversi aspetti, in particolare si può esprimere in termini di biocompatibilità meccanica, chimica e biologica. Questa suddivisione, comoda dal punto di vista concettuale, non deve far pensare ad aspetti disgiunti: di fatto l'influenza che tali tipi di biocompatibilità hanno l'uno sull'altro rende spesso difficile affrontarli separatamente. Così, ad esempio, una protesi metallica a contatto con il tessuto osseo può indurre, a causa di una diversa ripartizione dei carichi meccanici, un fenomeno di rimodellamento osseo non anatomico che può portare al malfunzionamento dell'impianto; allo stesso modo l'aggressività chimica del tessuto può agire sull'impianto con effetti corrosivi fino a provocarne in alcuni casi il cedimento.

- La **biocompatibilità meccanica** tra tessuto ed impianto esprime l'adeguatezza delle caratteristiche geometriche e meccaniche dell'impianto alla funzione cui è deputato. Questo non significa però solo che l'impianto deve essere sufficientemente robusto per sopportare gli sforzi ad esso indirizzati, ma indica anche che il suo inserimento nell'organismo non deve portare a sollecitazioni non anatomiche su altri organi tali da comprometterne la funzione o da indurre in essi modificazioni patologiche.

La valutazione della biocompatibilità meccanica di un impianto richiede l'analisi di alcune proprietà che ne definiscono la capacità di resistere alle sollecitazioni. Nei solidi l'applicazione ad un materiale di un sistema di forze (o carichi) dà luogo, in base alla loro

direzione e al punto di applicazione, a sforzi di trazione, compressione e taglio il cui effetto è la deformazione del materiale. Tale deformazione, per sforzi non eccessivi, risulta essere proporzionale al carico attraverso una grandezza denominata *modulo elastico* o *modulo di Young*. Per avere una completa biocompatibilità meccanica è opportuno che il materiale implantare abbia un modulo elastico non troppo diverso da quello del tessuto ospite: in caso contrario, una volta sottoposto a carico, l'insieme tessuto-impianto potrebbe essere soggetto a sforzi spuri dovuti ad una diversa deformazione delle due parti oppure, se l'impianto è troppo cedevole, può accadere che esso non contribuisca in modo efficace a sostenere il carico. La legge di Hooke vale solo per valori dello sforzo applicato inferiori al cosiddetto carico di snervamento, oltre il quale la deformazione del materiale diviene irreversibile (*deformazione plastica*); ulteriori modesti incrementi della forza applicata inducono grosse deformazioni, fino a giungere ad un valore del carico che provoca la rottura del materiale (*carico di rottura*).

Nella scelta di un materiale per impianti in cui la resistenza alle sollecitazioni sia particolarmente critica i parametri sopra citati non risultano sufficienti; infatti anche dimensionando l'impianto in modo che gli sforzi a cui deve essere sottoposto si mantengano ben al di sotto del carico di snervamento, esso si può rompere per fatica. La rottura per fatica, che è dovuta all'estendersi di microfratture presenti nel materiale, avviene dopo un tempo tanto più breve quanto più alto è il carico a cui il materiale è sottoposto; nel caso di carichi periodici la vita utile del materiale può essere espressa anche in numero di cicli di carico.

I materiali fragili, come le ceramiche, sono particolarmente esposti al rischio di rottura per fatica tanto da rendere difficile anche la determinazione del loro carico di rottura. L'effetto della struttura porosa, che concentra il carico su un'area efficace inferiore a quella geometrica, rende questi materiali più adatti a sopportare sforzi di compressione che di trazione. Per migliorarne le caratteristiche meccaniche i materiali ceramici possono essere sottoposti a trattamenti di sinterizzazione, che li rendono più compatti ed omogenei fino a conferire loro proprietà meccaniche paragonabili a quelle di materiali duttili come l'acciaio. Questi parametri, assieme ad altri quali la resistenza agli urti e la lavorabilità, consentono di valutare la biocompatibilità meccanica di metalli, leghe e materiali ceramici.

Un discorso diverso va fatto invece per i materiali polimerici e vetrosi, i quali devono essere considerati come fluidi ad elevata viscosità. La caratterizzazione dei materiali viscoelastici dal punto di vista meccanico deve essere effettuata tenendo conto

dell'andamento dello sforzo applicato nel tempo. In altre parole la capacità di un materiale di sopportare un certo carico e/o la deformazione che esso stesso gli procura dipendono anche dalla rapidità con cui il carico viene ad esso applicato. A questo proposito si osserva che l'osso corticale si comporta come un materiale viscoelastico, per il quale la deformazione aumenta all'aumentare del tempo di applicazione del carico. Bisogna inoltre aggiungere che l'osso, fatta eccezione per gli eventi traumatici, è normalmente sottoposto a sollecitazioni cicliche, alle quali mostra una resistenza meccanica crescente con l'aumentare della loro velocità di variazione [7].

Un'altra importante peculiarità del tessuto osseo dal punto di vista meccanico è la sua anisotropia, in ragione della quale le sue proprietà meccaniche (resistenza, elasticità etc.) dipendono fortemente dall'orientamento della microstruttura dell'osso nei confronti del carico. In particolare l'osso corticale risulta più resistente e rigido longitudinalmente che trasversalmente, dove si presenta sostanzialmente isotropo. Anche supponendo di poter prescindere dal carattere viscoelastico del tessuto osseo e dalla sua anisotropia, nessuno dei materiali attualmente impiegati in chirurgia ortopedica presenta caratteristiche simili a quelle dell'osso corticale; i materiali in uso in campo protesico hanno un modulo elastico molto più elevato di quello dell'osso. Quando si procede alla fissazione di elementi metallici all'osso si inducono quindi dei tensionamenti anomali, che sul lungo termine possono condurre alla rottura o alla mobilizzazione dell'impianto. Nell'utilizzo di materiali dotati di porosità superficiale, nei quali si sfrutta la crescita di nuovo osso all'interno dei pori al fine di creare un legame più duraturo tra protesi e osso, si deve tenere conto del fatto che l'osso che si forma nei pori di un materiale rigido non essendo adeguatamente caricato non avrà l'affidabilità meccanica dell'osso corticale. Una delle vie percorse per limitare questo tipo di problemi è quella di interporre tra protesi e impianto uno strato di materiale con caratteristiche meccaniche intermedie, come avviene nel caso dei cementi ossei acrilici.

- La **biocompatibilità chimica** coinvolge i processi chimici che si instaurano sia a livello locale che sistemico a causa della presenza dell'impianto. Perché si abbia biocompatibilità chimica è necessario che l'ambiente fisiologico e l'impianto, posti in presenza l'uno dell'altro, non subiscano modificazioni chimiche tali da compromettere la funzione implantare. Il principale fenomeno chimico avverso che si instaura nell'impiego di molti materiali da impianto è la **corrosione**. Le cause di questo fenomeno sono molteplici e dipendono fortemente dal materiale utilizzato per l'impianto e dalle sue caratteristiche superficiali; gli effetti prevalenti sono la perdita di consistenza e quindi

delle proprietà meccaniche dell'impianto e la dispersione nell'organismo dei prodotti di corrosione. Il principale tipo di corrosione con cui devono misurarsi i materiali candidati all'impianto (in particolare i metalli e le leghe) è la *corrosione galvanica*. Tale fenomeno, di natura elettrochimica, può svilupparsi ogni volta che si rende possibile il trasferimento di elettroni tra un "polo" che si ossida e cede elettroni (anodo) ed un "polo" che si riduce ed acquista elettroni (catodo). Perché il fenomeno possa avvenire con continuità è necessaria l'esistenza di una soluzione elettrolitica che agisca da veicolo per il necessario trasporto ionico. La corrosione galvanica si instaura per differenze di composizione (ossia per la presenza di due poli con un diverso valore di potenziale elettrico), per differenze di concentrazione della soluzione o anche per la presenza di livelli energetici diversi, come accade in caso di distorsioni o tensionamenti del materiale; la regione a più alto livello energetico risulta anodica rispetto a quella a più bassa energia, ed è dunque soggetta a corrosione. Per ovviare a questo fenomeno, che è di tipo superficiale, si effettua la *passivazione* delle superfici mediante deposizione di film di materiali passivanti o, nel caso più semplice, per ossidazione della superficie, fenomeno che in molti casi avviene in parte spontaneamente. Anche i materiali ceramici sono soggetti a fenomeni corrosivi, causati dai differenti livelli energetici presenti al confine tra i granuli di cui sono composti. In alcuni casi, come quello di alcune ceramiche porose, questo fenomeno viene sfruttato per rendere disponibili nel tessuto ospite determinate sostanze; è il caso, ad esempio, di alcune ceramiche calcio fosforo riassorbibili, la cui corrosione per via chimica e biologica dovrebbe favorire la mineralizzazione di osso neoformato.

- Per **biocompatibilità biologica** tra tessuto ed impianto si intende l'assenza di tossicità dell'impianto e l'assenza di reazioni difensive locali o sistemiche generate dall'organismo. La risposta indotta nell'organismo dall'impianto si esplica a due livelli: aspecifico e specifico.

La *risposta aspecifica* è la cosiddetta *reazione da corpo estraneo* e determina una prima reazione infiammatoria acuta con iperemia, essudato e presenza di leucociti polimorfonucleati. Se l'impianto viene riconosciuto come estraneo, l'iniziale infiammazione acuta può evolvere in una fase cronica con intervento di linfociti, plasmacellule ed istociti, nella quale l'organismo tenta di isolare il corpo estraneo in una capsula di tessuto fibroso ad opera di fibroblasti. In molti casi il materiale impiantato subisce processi corrosivi ed erosivi con il distacco di frammenti di impianto; questi ultimi, se hanno dimensioni sufficientemente contenute, possono essere oggetto di fagocitosi. Se i detriti fagocitati sono tossici, essi possono causare la morte delle cellule

fagocitanti le quali a loro volta dovranno essere rimosse da altri macrofagi in una reazione a catena che porta alla formazione di un'inflammatione cronica granulomatosa con presenza di tessuto fibroso necrotico. Se invece i frammenti non sono tossici ma allo stesso tempo non risultano digeribili, i macrofagi rilasciano enzimi extracellulari che possono portare alla progressiva rimozione dell'impianto; questi enzimi possono però risultare tossici per il tessuto circostante. Se infine i frammenti di impianto sono digeribili e non tossici, essi vengono distrutti e l'inflammatione scompare rapidamente.

La *risposta specifica* è costituita dalla reazione immunologica che l'organismo mette in atto a livello sistemico per difendersi da sostanze tossiche eventualmente presenti nell'impianto.

Sulla base delle risposte dell'organismo e delle caratteristiche dell'impianto, i biomateriali si possono classificare come:

- **bioinerti**, se una volta inseriti nel tessuto ospite non subiscono alcuna modificazione né stimolano alcun tipo di risposta nel tessuto circostante;
- **bioattivi**, se inducono una risposta del tessuto ospite nella regione peri-implantare, grazie ad interazioni tra le molecole all'interfaccia tessuto-impianto;
- **biodegradabili**, se favoriscono una risposta di tipo rigenerativo nel tessuto ospite, venendo gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuto neoformato.

In base al tipo di utilizzo per il quale sono destinati, i biomateriali possono venire distinti in due principali categorie: (1) materiali per impianti sostitutivi del tessuto osseo e (2) materiali per impianti protesici. Per gli impianti destinati alla sostituzione d'osso la ricerca è rivolta principalmente allo studio di biomateriali che possano stimolare la rigenerazione tissutale degradandosi poi completamente. Nel caso di materiali per impianti di tipo protesico, invece, la situazione è esattamente opposta: l'impianto, permanente o temporaneo, dovrà possedere notevoli proprietà meccaniche per garantire la stabilizzazione di fratture o la sostituzione di sezioni di osso, articolazioni distrutte o elementi dentali. Attualmente queste prestazioni sono ottenute tramite metalli, leghe metalliche e, in casi specifici, tramite materiali polimerici o ceramici.

1. MATERIALI PER IMPIANTI SOSTITUTIVI DEL TESSUTO OSSEO

Nella valutazione del successo di una protesi si devono introdurre fattori come la sua durata e gli effetti indotti a livello locale e sistemico in termini di patologie e disagio del

paziente. Le ragioni di questi effetti secondari avversi, che in genere si manifestano a distanza di tempo, sono da ricercarsi nella scarsa biocompatibilità dei materiali da impianto. Un impianto scarsamente biocompatibile è sede di effetti secondari quali l'incapsulamento, la corrosione e l'erosione, che possono portare al cedimento meccanico dell'impianto o all'induzione di fenomeni avversi a livello sistemico. Nel corso di questo secolo è stata portata avanti da un considerevole numero di studiosi la ricerca di nuovi materiali da impianto che avessero come requisito fondamentale un buon grado di biocompatibilità e che svolgessero un ruolo attivo nel favorire la rigenerazione ossea in sede di inserzione implantare. In questo modo l'impianto non è più considerato semplicemente come un mezzo di sostegno funzionale dell'osso ma rappresenta l'agente che induce o che perlomeno stimola il tessuto ospite a formare nuovo osso. Se l'impianto gode di simili proprietà, in molti casi è auspicabile che esso venga progressivamente riassorbito parallelamente alla crescita di nuovo osso, fino a scomparire a guarigione avvenuta. Il problema tuttora aperto è quello di realizzare impianti la cui velocità di riassorbimento e le cui potenzialità osteorigenerative siano tali da garantire una stabilità meccanica e una funzionalità sufficienti per tutto il periodo di guarigione. La ricerca di materiali di questo tipo si è subito orientata verso quelli che vengono definiti come *analoghi tissutali dell'osso*, cioè quei materiali, naturali o sintetici, che presentano caratteristiche chimiche e morfologiche analoghe a quelle del tessuto osseo. Si ritiene, infatti, che la presenza *in situ* di determinate componenti del tessuto osseo (di origine naturale o sintetica) possa favorire la formazione di nuovo osso.

I risultati ottenuti nel campo dell'implantologia ortopedica con questo approccio "biocompatibile" sono incoraggianti, anche se ad oggi non si è ancora in grado di realizzare impianti dotati di proprietà meccaniche adeguate a gran parte dei dispositivi protesici. Per questa ragione l'applicazione tipica dei sostituti d'osso è il riempimento dei difetti ossei, dove in genere si richiede al più la stabilità dimensionale dell'impianto; in particolare questi materiali si pongono in molti casi come un'attraente alternativa ai trapianti d'osso. A questo proposito si deve riconoscere che, laddove sia possibile, è auspicabile l'utilizzo di osso autologo fresco, specialmente se si tratta di osso corticale ricco di elementi cellulari, poiché è certamente quello che gode delle più accentuate proprietà osteoinduttive; tuttavia il prelievo di osso dal paziente stesso non è sempre accettabile dal punto di vista clinico e comunque risulta necessariamente limitato in quantità. In alternativa si può ricorrere all'osso omologo, anch'esso però scarsamente reperibile, o a quello eterologo, ma i problemi di sterilizzazione e conservazione uniti ai

dubbi relativi alla sua reale efficacia ne limitano fortemente l'uso. In questo scenario si inseriscono i materiali analoghi tissutali dell'osso, che rendendo disponibili nel sito di impianto certe componenti organiche e inorganiche del tessuto osseo favoriscono il processo di rigenerazione.

Tra i materiali utilizzati come analoghi tissutali si possono annoverare:

Collagene

Il collagene è uno dei principali costituenti del tessuto osseo ed è pertanto ragionevole chiedersi se non sia dotato di proprietà osteostimolanti. Esperimenti di riempimento di cavità ossee con collagene xenogenico [8] hanno dimostrato che se preventivamente denaturato il collagene non genera reazioni immunologiche; l'impianto è soggetto a degradazione con formazione di tessuto di granulazione e quest'ultimo viene poi gradualmente rimpiazzato da tessuto osseo neoformato. Da ulteriori studi [9, 10] è emerso che gli impianti di collagene sono in grado di accelerare la guarigione dei difetti ossei.

I principali limiti nell'utilizzo di questo materiale sono rappresentati dalla reazione infiammatoria indotta nel tessuto accompagnata dall'intervento di cellule giganti [11] e l'assenza di proprietà tensili che garantiscano anche la semplice stabilità meccanica dell'impianto. A quest'ultimo limite si può ovviare con impianti compositi realizzati ad esempio con reti di nylon [12].

Proteina ossea morfogenetica (BMP)

Negli anni '60 è stata ipotizzata l'esistenza, all'interno della matrice ossea, di una proteina non nota chiamata genericamente BMP (Bone Morphogenetic Protein), capace di stimolare il differenziamento di cellule mesenchimali in osteoblasti [13, 14]. L'effetto osteoinduttivo di questa proteina è stato dimostrato attraverso l'impianto della matrice ossea demineralizzata nel tessuto osseo ed in quello muscolare, mentre non è stata osservata alcuna neoformazione d'osso inserendo il materiale all'interno di fegato, milza o rene [15]. L'impiego di frammenti di osso omologo demineralizzato in HCl ha consentito la riparazione di larghi difetti ossei, con risultati paragonabili a quelli ottenuti mediante trapianti autologhi e nettamente superiori a quelli ottenuti usando osso omologo conservato [16-18].

I limiti nell'applicazione di questo materiale da impianto sono legati alla forma granulare e alle difficoltà di reperimento e conservazione: la forma granulare ne impedisce l'utilizzo in impianti soggetti a carico meccanico; d'altronde non è possibile sottoporre il materiale

a processi di consolidamento come la sinterizzazione, per non distruggere la BMP contenuta nella matrice. E' stato anche dimostrato che solo i granuli di diametro compreso tra 74 e 420 μm possiedono attività osteoinduttiva, mentre quelli di dimensioni inferiori sono probabilmente soggetti a fagocitosi troppo rapidamente per consentire la liberazione della BMP in modo efficace [19]. L'altra limitazione nasce dal fatto che l'effetto osteoinduttivo della proteina ossea morfogenetica risulta essere specie-specifico; questa condizione di specificità sembra essere legata alla presenza di frazioni proteiche ad alto peso molecolare, pertanto per poter utilizzare con successo la matrice ossea eterologa è necessario estrarre ed eliminare tali frazioni proteiche ottenendo così l'effetto osteoinduttivo desiderato. Da un punto di vista della pratica clinica, però, questa modalità non appare oggi facilmente percorribile per via del complesso procedimento di preparazione richiesto; d'altra parte la scarsa disponibilità di matrice ossea omologa limita l'uso di tale materiale ai campi odontoiatrico e maxillo-faciale, dove essa viene impiegata nella riduzione delle tasche periodontali [20] e nella ricostruzione dei difetti mandibolari [21].

Ceramiche calcio-fosforo

Le prime sperimentazioni relative ad impianti endossei contenenti composti del calcio, risalenti all'inizio del secolo, erano legate alla convinzione che fosse sufficiente rendere disponibili degli ioni calcio nel sito implantare per stimolare l'osteogenesi, ipotesi che si è presto rivelata priva di fondamento. Successivi studi hanno evidenziato come alcuni fosfati di calcio, pur non godendo di proprietà osteoinduttive in senso stretto, siano in grado di accelerare il processo di formazione di nuovo tessuto osseo. I composti a base di calcio e fosforo si differenziano tra loro dal punto di vista chimico per il rapporto tra ioni calcio e ioni fosfato (rapporto Ca/P) e per il loro grado di idratazione.

2. MATERIALI PER IMPIANTI PROTESICI

Nella quotidiana pratica chirurgica in campo ortopedico come in quello odontoiatrico spesso non è possibile lavorare con i soli sostituti d'osso, poiché in molti casi stabilità, resistenza e durata dell'impianto si rivelano dei pre-requisiti essenziali per la buona riuscita dell'intervento, importanti soprattutto se si considera l'esito in tempi lunghi.

Queste proprietà risultano indispensabili per le protesi, specie per quelle di tipo permanente.

Tra i materiali utilizzati per la produzione di protesi ricordiamo:

Polimeri

I polimeri in campo ortopedico vengono usati principalmente per la realizzazione di articolazioni e come cementi ossei.

Con il primo polimero sperimentato, il *politetrafluoroetilene* (PTFE o *Teflon*), fu realizzata una coppa acetabolare per protesi totale dell'anca da accoppiare con una testa femorale in acciaio speciale [22]. Questo tipo di protesi venne ben presto abbandonata a causa delle scarse proprietà meccaniche del materiale e per la grande quantità di detriti liberati a seguito dell'erosione meccanica della coppa acetabolare da parte della testa femorale metallica. Al posto del PTFE furono introdotti altri polimeri, tra i quali si impose il *polietilene ad altissima densità* (UHMWPE) [23].

Tra le caratteristiche salienti dei materiali polimerici vi è la notevole inerzia chimica che, a meno di impurezze o tracce di monomeri residui, viene mantenuta anche all'interno dell'ambiente fisiologico. Le proprietà meccaniche dei polimeri dipendono fortemente dal loro peso molecolare e dalla loro configurazione spaziale, che può essere lineare, ramificata o tridimensionale. Le ramificazioni impediscono alle catene polimeriche di impacchettarsi strettamente le une sulle altre e ne limitano la flessibilità. Il peso molecolare e la linearità della catena contribuiscono inoltre a determinare la temperatura di transizione vetrosa (Tg) del polimero, la quale fornisce un'indicazione relativa alle proprietà meccaniche del materiale in funzione della temperatura: per valori inferiori a Tg il materiale si presenta vetroso e non ammette movimenti relativi tra le catene, mentre al di sopra di Tg esso risulta viscoso e plastico. La struttura ripetitiva dei polimeri tende a dare luogo ad una fase cristallina tanto più marcata quanto più lineare è la catena. Le proprietà meccaniche dei polimeri dipendono però soprattutto dalla fase amorfa che riempie gli spazi tra i cristalliti, che per temperature superiori a Tg possiede una natura viscosa conferendo al materiale elasticità, resistenza meccanica e capacità di assorbimento degli urti. Pertanto in campo ortopedico si utilizzano preferibilmente polimeri lineari come l'UHMWPE, i quali grazie all'elevata densità che riduce la cristallinità e la mobilità della catena hanno caratteristiche meccaniche superiori.

Un altro polimero di largo uso è il *polimetilmetacrilato* (PMMA) il quale viene impiegato, in unione con resine autopolimerizzanti, come cemento per la fissazione degli steli delle

protesi [24]. I cementi ossei utilizzati come adesivi all'interfaccia tra tessuto osseo ed impianto hanno dei requisiti particolarmente critici; si richiede in particolare che consentano un trasferimento del carico meccanico all'impianto in modo il più possibile uniforme al fine di evitare che una parte dell'osso, privata del carico, sia soggetta a riassorbimento [25]. Per fissare gli impianti al tessuto osseo la polimerizzazione del PMMA si fa avvenire *in situ* attraverso una reazione catalizzata dal metilmetacrilato monomero. Quest'ultimo risulta essere citotossico, ma operando con cura se ne possono contenere gli effetti avversi in modo soddisfacente [26]. Un aspetto vantaggioso dell'uso dei cementi ossei per la fissazione di impianti è la possibilità di rendere disponibili *in situ* attraverso il cemento eventuali farmaci, esercitando un certo controllo sulla dinamica del loro rilascio.

Carboni

L'interesse per i carboni come materiali protesici è legato ad una serie di caratteristiche non riscontrabili in altri materiali. Oltre alle ben definite forme cristalline di diamante e grafite, il carbonio può assumere alcune forme quasi cristalline in cui il grado di perfezione della struttura cristallina e la distribuzione morfologica dei cristalliti e dei pori danno origine a materiali con caratteristiche meccaniche molto diverse tra loro. In particolare, con opportuni processi di fabbricazione è possibile ottenere materiali dotati di elevata resistenza meccanica ma nel contempo non eccessivamente rigidi, caratteristica non riscontrabile in nessun altro materiale e che è invece tipica del tessuto osseo. I carboni, e in particolare quello pirolitico, possono subire notevoli allungamenti elastici prima della rottura e sono dotati di resistenza alla rottura per fatica dovuta a sforzi ciclici di compressione, sforzi cui sono normalmente sottoposte le articolazioni.

Ceramiche e biovetri

- Le **ceramiche** sono materiali in generale duri e fragili, quindi poco adatti ad essere utilizzati in applicazioni che sottopongono l'impianto ad elevate sollecitazioni meccaniche. A questa osservazione di carattere generale esiste almeno un'eccezione, rappresentata dall'*allumina* (Al_2O_3), che per la sua elevata resistenza alla corrosione e all'erosione per frizione ha trovato applicazione, ad esempio, come coppa acetabolare nelle ricostruzioni dell'articolazione femorale. Questo tipo di impiego richiede che il materiale utilizzato sia dotato di un'elevata resistenza agli sforzi di tensione e alla fatica e che sia soggetto ad una limitata usura per frizione nello scorrimento tra le superfici

accoppiate. Per ottenere allumina con caratteristiche di questo tipo è necessario controllare il processo di sinterizzazione in modo da avere una ceramica dotata della massima densità e di grani di dimensioni inferiori a 10 μm . A questo scopo all' Al_2O_3 si aggiunge lo 0.25% di MgO, che durante la sinterizzazione facilita l'eliminazione degli spazi vuoti. Per ottenere buoni risultati in termini di usura e di quantità di detriti prodotti è necessario curare molto la rugosità superficiale dell'impianto. Nei materiali fragili, infatti, i difetti superficiali non essendo soggetti a deformazione plastica come nei materiali duttili esercitano ad ogni movimento relativo forti sollecitazioni sui grani più esposti, fino al loro distacco con produzione di detriti ed ulteriore deterioramento della superficie di contatto. Tests di usura hanno dimostrato che nella protesi dell'anca utilizzando l'accoppiamento allumina-allumina si ottiene una produzione di detriti per usura meccanica dieci volte inferiore a quella osservabile nell'accoppiamento metallo-polietilene. [27].

L'inerzia chimica dell'allumina in ambiente fisiologico ha portato al suo utilizzo anche come ricoprente per protesi metalliche dotate di migliori proprietà meccaniche.

Questo ricoprimento è effettuato con la tecnica denominata *plasma spray*, che consiste nell'investire il materiale da ricoprire con un getto di vapori del materiale coprente ad altissima temperatura; con questa stessa tecnica vengono effettuati rivestimenti anche utilizzando un'altra categoria di materiali: i biovetri.

- I **biovetri**, come suggerisce il loro nome, sono dei materiali vetrosi, commercializzati come Bioglass e Cervital e costituiti da diverse proporzioni di biossido di silicio, ossido di calcio, ossido di magnesio e fosfato di calcio. Tali materiali presentano una spiccata resistenza all'abrasione, più elevata di quella di altri materiali ceramici, ma appaiono dotati di scarse proprietà meccaniche che ne limitano l'utilizzo al ricoprimento di protesi metalliche o alla realizzazione di materiali compositi nei quali la resistenza meccanica è conferita da altri componenti. L'interesse per i biovetri è legato in particolare alla possibilità di realizzare un buon legame meccanico tra osso e impianto, grazie alla loro struttura porosa che permette al tessuto osseo di invadere il materiale.

Ceramiche e biovetri hanno nella scarsa lavorabilità e soprattutto nell'estrema fragilità il loro punto più debole, che ne sconsiglia l'utilizzo per la realizzazione di manufatti implantari se non in combinazione con cores di altra natura, prevalentemente metallica.

Metalli e leghe

I primi esperimenti relativi all'impiego di impianti metallici per la fissazione di fratture ossee coronati da un certo successo risalgono al 1886 ad opera di Hansmann. Da allora, per un periodo di circa cinquant'anni, si sono susseguiti numerosi tentativi relativi all'utilizzo di svariati metalli come argento, alluminio, rame e diversi tipi di acciaio, ma studi su modello animale hanno evidenziato ben presto numerosi problemi di biocompatibilità. Il limite principale è legato alla facilità con cui l'ambiente fisiologico sottopone a corrosione molti metalli. Per questa ragione intorno agli anni '20 è iniziata la sperimentazione di leghe metalliche in grado di resistere alla corrosione, e tra queste è stata posta particolare attenzione allo studio degli acciai.

- Gli **acciai inossidabili** sono materiali di fondamentale importanza a livello metallurgico per la loro ampia diffusione in tutti i campi dell'industria. Tali leghe sono costituite da una base di ferro con basso contenuto di carbonio e un'alta percentuale di cromo. La presenza del carbonio se da un lato determina ottime proprietà meccaniche dall'altro è però responsabile della tendenza alla corrosione in ambiente biologico, tenuta a freno dalla passivazione superficiale indotta dal cromo. Un'estrema durezza può essere raggiunta grazie all'uso del molibdeno, tra l'altro molto costoso [28].

Gli acciai sono soliti essere distinti in *austenitici*, *ferritici* e *martensitici*, a seconda della presenza delle omonime fasi ottenibili tramite diverse procedure di produzione del materiale.

Se gli acciai martensitici possiedono una durezza tale da renderli il materiale preferibile per la creazione di strumenti chirurgici, sono tuttavia quelli austenitici a possedere la maggiore stabilità in ambiente biologico.

Gli acciai attualmente più usati in campo ortopedico sono quelli classificati a livello internazionale con le sigle *316* e *317*; si tratta di acciai austenitici che hanno il pregio di associare un'elevata resistenza meccanica ad una discreta resistenza alla corrosione, a differenza di altri acciai ad alto tenore di ferrite e di martensite che privilegiano uno di questi aspetti a discapito dell'altro.

- Negli anni '30 è iniziata la sperimentazione di **leghe di cobalto**, che oltre al cobalto contengono di solito cromo, molibdeno e talvolta nickel. Le leghe al cobalto hanno dato buoni risultati in termini di tollerabilità [29]. Tra esse citiamo il *Vitallium*, una lega che associa al cobalto il 30% di cromo, lo 0.5% di carbonio e il 7% di tungsteno (successivamente sostituito dal 5% di molibdeno).

Le leghe metalliche, pur avendo notevolissime proprietà meccaniche di resistenza alla flessione, alla trazione, alla compressione, all'usura e un'ottima lavorabilità, mostrano tuttavia i loro limiti intrinseci nella facilità alla corrosione con conseguente rilascio di ioni metallici che ne pregiudica anche la tollerabilità da parte dell'organismo [30], nella loro elevata densità e soprattutto nella scarsa biocompatibilità di alcune di esse.

- Il **titanio** è un materiale di utilizzo più recente rispetto a quelli appena esaminati, e presenta un duplice vantaggio: è un metallo, e come tale è dotato di intrinseche capacità di resistenza a carichi di entità anche elevata, e allo stesso tempo è un materiale sostanzialmente bioinerte.

Il *titanio puro* (>99% in peso) è un metallo molto tenace, le cui caratteristiche possono essere variate aggiungendo o sottraendo ossigeno. Particolarmente usato per i rivestimenti superficiali è il titanio di tipo 4, a più elevato contenuto in ossigeno, che presenta duttilità e resistenza maggiori.

Molto diffuse sono pure le *leghe di titanio*, tra le quali meritano una menzione particolare la "classica" lega *Ti-6Al-4V* (la sigla non è altro che la formula della composizione con le percentuali in peso degli elementi principali), la più recente *Ti-5Al-2.5Fe*, e le leghe contenenti niobio in sostituzione del vanadio, poiché quest'ultimo ha suscitato alcuni dubbi relativi alla sua tollerabilità.

Il titanio quando si trova a contatto con l'ambiente biologico viene ricoperto da uno strato di ossidi quali TiO , TiO_2 , TiO_3 per un fenomeno di passivazione spontanea che mantiene i processi corrosivi a livelli molto bassi, anche se non del tutto assenti [31].

Da molto tempo si ritiene che tali ossidi possano favorire il legame chimico del titanio col tessuto osseo [32], ma ricerche più recenti hanno dimostrato la presenza costante, in campioni bioptici *in vivo*, di uno strato amorfo di proteoglicani interposti tra matrice e superficie metallica [33].

INTRODUZIONE ALLE TEMATICHE DELLA RICERCA

Nel corso della sua storia l'implantologia orale si è servita impianti di forme varie (lame, aghi, dischi, griglie, cilindri, viti) costituiti da materiali di diverso tipo, con lo scopo di assicurare una sempre maggiore stabilità nelle diverse zone delle ossa mascellari prive di denti. La moderna implantologia, sostenuta da una rigorosa ricerca scientifica, ha dimostrato che la forma più idonea per un impianto è quella conica, poiché simula la radice di un dente naturale, e i risultati migliori si osservano in particolare nel caso di dispositivi conici "a vite", nei quali la presenza di spire in superficie garantisce una stabilità di tipo meccanico essenziale per l'integrazione dell'impianto nel tessuto osseo.

Numerosi studi sono stati dedicati oltre che al miglioramento della forma anche ed in particolare ai materiali costituenti l'impianto e alle proprietà della superficie destinata a trovarsi in contatto con l'osso.

Quando un impianto metallico è inserito chirurgicamente, la sua superficie esterna entra in stretto contatto con il tessuto ospite, e questo porta ad una serie di interazioni fisico-chimiche e biochimiche che coinvolgono macromolecole tissutali e molecole provenienti dai fluidi biologici [34].

Pertanto per migliorare l'osteointegrazione implantare sono stati suggeriti ed applicati numerosi trattamenti volti a modificare le caratteristiche di superficie [35]. E' noto che trattamenti applicati alla superficie implantare ne inducono modificazioni sia nella composizione chimica che nella topografia [36] e la ricerca in questo campo si è adoperata in modo particolare al fine di ottenere superfici che consentissero un maggior contatto osso-impianto [37, 38].

I trattamenti per modificare la superficie di un impianto possono essere suddivisi in tre principali categorie [39]: (1) fisici, (2) chimici ed elettrochimici e (3) biochimici.

1. TRATTAMENTI FISICI

Determinano una modificazione delle caratteristiche di superficie attraverso l'applicazione di azioni esterne. Tra questi sono di particolare interesse i tre seguenti trattamenti meccanici:

Cutting e Turning

Queste due tecniche possono essere raggruppate per le caratteristiche dimensioni delle irregolarità che si creano quando vengono applicate sulla superficie metallica.

- Il **cutting** (taglio) si ottiene tipicamente attraverso l'utilizzo di una troncatrice: un classico strumento per il cutting è la troncatrice con disco rotante al carburo di silicio (SiC). L'operatore può variare la pressione e la velocità di taglio in modo da controllare, almeno in un ristretto range di proprietà, le caratteristiche della superficie. Tuttavia se si vogliono ottenere superfici omogenee, seppure non lisce, la macchina per il cutting non deve essere utilizzata come trattamento finale, in quanto con questa tecnica si ottengono superfici rigate ed irregolari, con un grado molto basso di rifinitura. Inoltre le macchine per il cutting inducono necessariamente deformazioni meccaniche su materiali quali titanio e leghe di titanio, pertanto i bordi del taglio in questi casi appaiono generalmente molto alterati.

- Il **turning** (tornitura) è un procedimento alternativo al cutting che si basa sull'utilizzo di un dispositivo di taglio in acciaio inossidabile. Anche il turning come il cutting conferisce alla superficie originaria nuove caratteristiche morfologiche, ma le condizioni operative sono in questo caso molto meglio riproducibili. Dall'analisi al microscopio ottico è possibile rilevare un'elevata anisotropia nella distribuzione delle irregolarità di superficie, anche osservando il campione in scala micrometrica. In particolare, si possono sempre riconoscere delle scanalature ad andamento concentrico legate al procedimento di tornitura. In caso di materiali metallici, il turning determina solitamente delle alterazioni: i granuli cristallini scompaiono, le proprietà di superficie risultano modificate e in generale la durezza di superficie aumenta. I valori del parametro che misura la rugosità media (R_a) oscillano tra 0.3 e 0.6 μm .

Smoothing

Questo procedimento consente di ottenere un grado di tornitura più fine e si realizza per mezzo di fogli sabbati con particelle abrasive, generalmente SiC, di differente diametro: le particelle più piccole sono utilizzate per gli stadi di lavorazione più avanzati (*polishing*) mentre quelle più grandi vengono usate nelle prime fasi per rendere la superficie rugosa (*grinding*). Durante il processo di smoothing è importante evitare gli effetti di graffiatura che potrebbero danneggiare la superficie; per questa ragione è preferibile trattare la superficie metallica con una sequenza di particelle di diametro decrescente.

Per le proprietà meccaniche del titanio e delle sue leghe ci si aspetta che alcune particelle abrasive possano venire incluse nella matrice metallica durante il trattamento: questo fenomeno è comunemente indicato come *inquinamento da abrasione* (abrasive pollution). Ad esempio l'analisi chimica di superfici sottoposte a smoothing potrebbe rilevare la presenza non solo di Ti, O, Al, V, Fe, C, N, ma anche di Si, Ca, P eccetera. Questi elementi potrebbero risultare non compatibili con le applicazioni alle quali il materiale implantare è destinato; di conseguenza gli elementi indesiderati devono essere rimossi alla fine della procedura mediante pulizia con un solvente apposito, sonicazione o altro.

Le particelle abrasive sono generalmente costituite da carburo di silicio o da diamante industriale (con particelle di diametro anche minore di 200 μm). I valori tipici di R_a vanno da 0.1 μm (superfici sottoposte a polishing) fino a 1 μm (superfici più rugose). In alternativa si può utilizzare della polvere di allumina [40], e in tal caso i campioni sottoposti a smoothing mostrano solitamente delle irregolarità superficiali, delle piccole scanalature di 1-2 μm di ampiezza e 80 nm di profondità. In linea generale le irregolarità presenti sulle superfici sottoposte a smoothing hanno una distribuzione omogenea [41].

Blasting

Il processo di blasting richiede che le particelle abrasive utilizzate vengano forzate contro la superficie mediante l'utilizzo di un liquido trascicante; quest'ultimo è generalmente rappresentato da aria compressa, che scorrendo attraverso un dispositivo per l'espulsione (ejector) travolge le particelle incontrate lungo il suo cammino e le trasporta con sé. A seguito della dinamica del contatto tra la superficie e le particelle forzate contro di essa, il trattamento di blasting può produrre valori di rugosità anche molto elevati. Il parametro fondamentale nel processo di blasting è la dimensione delle particelle: alcuni autori sostengono che le particelle con diametro superiore a 0.1 mm non siano in grado di

aumentare i valori dei parametri di rugosità [42], mentre secondo altri riescono a farlo tutte le particelle fino a 900 μm di grandezza [43].

Come nel caso dello smoothing, anche nel blasting le particelle abrasive possono causare un inquinamento da abrasione, potenzialmente responsabile dei cambiamenti nella capacità d'interazione chimico-fisica delle superfici trattate con i tessuti. Le particelle solitamente utilizzate per il blasting sono costituite da allumina, corindone, rutilo o idrossiapatite. I valori di R_a in superfici trattate con blasting coprono un ampio range, andando da 0.5-1.5 μm fino a 2-6 μm , in base alle dimensioni delle particelle utilizzate. Da alcuni studi comparativi riguardanti i processi di smoothing e turning [44, 45] è emerso che le superfici sottoposte a turning, nonostante le tipiche irregolarità dovute alle abrasioni prodotte durante il processo, sono più lisce di quelle sottoposte a blasting; per queste ultime i valori dei parametri di rugosità dipendono dalle dimensioni delle particelle utilizzate. È importante sottolineare che la rugosità di superficie dipende dalle dimensioni delle particelle ma non dipende dalla natura di queste: particelle più piccole determinano una rugosità più fine e viceversa [46].

Dall'analisi degli effetti del blasting eseguito con particelle di rutilo risulta ancora evidente l'esistenza di una correlazione tra le dimensioni delle particelle e l'ampiezza della rugosità, ma tale correlazione non è così marcata come nel caso dell'allumina [42, 47]. Particelle di grandezza intermedia sembrano portare ad una distribuzione omogenea delle irregolarità di superficie mentre particelle più grandi determinano la formazione di piccole ma frequenti aree appiattite sulla superficie trattata, e un ulteriore incremento nelle dimensioni delle particelle non determina alcun significativo incremento nelle dimensioni delle irregolarità.

Per quanto riguarda il corindone, uno studio comparativo eseguito utilizzando per il blasting rispettivamente particelle di corindone e sfere di vetro [48] ha rivelato sulle superfici trattate differenze di topografia dovute principalmente alle dimensioni delle particelle piuttosto che alla composizione superficiale.

Recentemente [43] sono state messe a confronto particelle di corindone e allumina di diverso diametro e relativamente grandi (200, 600, 900 μm) e sono state osservate interessanti differenze tra i due tipi di materiali in relazione al loro effetto sulle superfici trattate. Innanzitutto le particelle di allumina sembrano essere in grado di produrre una rugosità di superficie maggiore rispetto a quelle di corindone; questo fatto potrebbe tuttavia essere legato ad una diversa distribuzione nelle dimensioni delle particelle, come accade spesso per i prodotti disponibili in commercio. In base a misurazioni di tipo

elettrochimico del potenziale elettrico di superficie e della polarizzazione si è potuto ipotizzare che il contributo dello spessore dello strato di ossido di titanio alla resistenza elettrica sia tanto più basso quanto maggiore è la grandezza delle particelle abrasive. Tale grandezza influenza inoltre anche l'intensità della corrente elettrica in grado di passare attraverso i campioni in titanio: questo fatto è in accordo con l'evidenza sperimentale che una maggior superficie di contatto è prodotta da particelle più grandi.

2. TRATTAMENTI CHIMICI ED ELETTROCHIMICI

I trattamenti chimici sono idonei se si vogliono produrre modificazioni nella composizione chimica dei materiali originari, in particolare a livello dello strato superficiale. In generale questi trattamenti prevedono l'immersione dei campioni in soluzioni polarizzate (acquose o organiche) di differenti composti chimici: gli acidi inorganici producono modificazioni più profonde rispetto a solventi come l'etanolo o l'acetone. Il titanio e le sue leghe mostrano un diverso grado di reattività che dipende a sua volta dalla natura della miscela acida: a seconda del tipo di miscela utilizzata, pertanto, è possibile indurre la formazione di uno strato protettivo (*passivazione*), la dissoluzione di composti ceramici, lo smussamento delle irregolarità di superficie o la formazione di micropori circondati da gel. In ogni caso gli effetti di questi metodi sono ristretti alle modificazioni di superficie e raramente vengono utilizzati per indurre cambiamenti nella forma dei campioni.

Mordenzatura acida

E' ottenuta in genere attraverso l'immersione in soluzioni acquose non ossidanti (fatta eccezione per la miscela HF/HNO₃) a temperatura ambiente o a temperature più elevate. Gli effetti sulla superficie sono legati a reazioni di ossidoriduzione responsabili della dissoluzione dei metalli in forma di sali solubili e della liberazione di idrogeno gassoso che, almeno in parte, aderisce alla superficie metallica.

I materiali come il titanio e le sue leghe normalmente reagiscono con l'ossigeno, che forma uno strato di ossido da cui dipende la bassissima reattività chimica della superficie. Solo pochi acidi sono in grado di reagire con l'ossido di titanio: *HCl*, *H₂SO₄* e *HF*. L'acido fluoridrico è il miglior solvente, ma è estremamente reattivo per cui è preferibile utilizzare uno degli altri due.

Spesso la mordenzatura con acidi su una superficie in titanio viene eseguita dopo aver sottoposto il materiale a trattamenti di tipo meccanico (turning, blasting, ecc.) che in genere modificano le caratteristiche superficiali in maniera macroscopica. Dato che una mordenzatura molto forte può ulteriormente modificare la morfologia di superficie, di solito i trattamenti con gli acidi sono effettuati in maniera abbastanza blanda, esclusivamente per appianare le irregolarità di superficie: in tal modo si ottengono superfici con piccole irregolarità ed un nuovo profilo di rugosità va a sostituire quello originario.

I trattamenti meccanici possono influenzare la reattività di superficie alla mordenzatura; tutto dipende da quanto l'estensione dell'area superficiale è aumentata a seguito del trattamento meccanico e quindi dall'estensione della superficie implantare esposta all'azione dell'acido.

Le superfici chiamate *SLA (sand-blasted large grit and acid-etched)* sono caratterizzate da differente topografia e differente composizione chimica e sono ottenute dalla combinazione di un trattamento di blasting con una mordenzatura acida.

Il risultato della mordenzatura acida su superfici rese relativamente lisce mediante un precedente trattamento meccanico è in alcuni casi quello di produrre ampie irregolarità. E' questo il caso, ad esempio, del trattamento con HCl/H₂SO₄ successivo a smoothing con allumina, dove il risultato finale è una superficie irregolare e rugosa, e in questo caso si avrà pertanto un aumento della potenziale area di contatto tra la superficie implantare e il tessuto ospite [49].

Mordenzatura alcalina

Tra i trattamenti chimici utilizzati per modificare la superficie di un impianto si può annoverare anche l'utilizzo di NaOH o di altre soluzioni acquose alcaline concentrate. L'elevato pH di queste soluzioni favorisce la formazione di gruppi ossidrilici sul film di ossido di titanio che si è creato sulla superficie implantare; si formano così dei sali di titanato che successivamente si dissolvono e in questo modo la superficie viene progressivamente ricoperta da un idrogel che può precipitare in alcune zone. La topografia del metallo sottostante risulta pertanto alterata e si modificano le proprietà relative alla sua rugosità. A temperature maggiori di T_{amb} la cinetica di reazione risulta accelerata e in queste condizioni si ha spesso la formazione di imperfezioni sub-micrometriche. Per questo motivo la mordenzatura alcalina viene di solito eseguita a più di 100°C e in tal modo dopo aver asciugato la superficie questa non risulterà più

idrofobica grazie alla presenza dei gruppi ossidrilici che possono anche legare covalentemente altre molecole.

Trattamenti elettrochimici

I trattamenti elettrochimici si realizzano connettendo il dispositivo metallico da modificare al polo positivo di un circuito elettrico. Il dispositivo è immerso in una soluzione elettrolitica (non sempre acquosa) contenente ioni o sostanze ossidanti. Nel sistema che si viene così a creare la superficie del dispositivo funge da anodo e il potenziale che viene applicato dall'esterno regola l'andamento del processo.

Si possono distinguere tre metodi per il trattamento elettrochimico di una superficie in titanio:

- *elettro-erosione*, che porta alla formazione di una regione localizzata di materiale metallico fuso;
- *elettro-polishing*, che determina una fine dissoluzione delle imperfezioni di superficie con un effetto livellante su scala micrometrica;
- *anodizzazione*, che permette allo strato di ossido di titanio di accrescersi passando dai 5-10 nm di spessore tipici dell'ossidazione atmosferica fino a 40 μm .

Applicando i trattamenti elettrochimici è possibile ottenere modificazioni in un vasto spettro di proprietà di superficie e con un ampio margine di variabilità, grazie alla possibilità di regolare finemente le condizioni operative del processo.

Deposizione

Questa metodica, come suggerisce il nome, consiste nella deposizione di sostanze chimiche sulla superficie da trattare. Tra le diverse sostanze utilizzate vi sono composti metallici (ad esempio Ti puro), ossidi e ceramiche. Generalmente queste sostanze vengono prima rese volatili attraverso l'esposizione ad una sorgente di energia per poi essere trasportate sulla superficie da trattare. Un materiale largamente utilizzato per questa procedura è l'*idrossiapatite (HA)*, la quale crea sull'impianto uno strato che mima la componente minerale dell'osso favorendo così l'integrazione dell'impianto con il tessuto ospite circostante. Il processo di osteointegrazione viene favorito dalla rugosità di superficie dovuta allo strato esterno neodeposto, che oltretutto rappresenta una riserva di calcio; inoltre HA viene trasformata nella più stabile fluoroapatite.

I composti utilizzati per la deposizione, come accennato in precedenza, necessitano di una sorgente di elevata energia per essere convertiti in sostanze volatili. Le fonti energetiche

possono essere ottenute mediante combustione (miscela C_2H_2/O_2), arco elettrovoltaico o plasma spray. L'aumento di rugosità di superficie dovuto a trattamenti di deposizione chimica sembra portare ad un miglioramento nelle proprietà biomeccaniche implantari [44, 46, 50, 51]. Recentemente è stato proposto l'utilizzo di sostanze "bioattive" da applicare sulla superficie degli impianti. I *composti bioattivi* sono quelli in grado di attivare specifiche interazioni tra l'impianto e l'osso stimolando la crescita di nuovo tessuto osseo sulla superficie implantare (ne è un esempio l'HA).

3. TRATTAMENTI BIOCHIMICI

Questi trattamenti hanno lo scopo di controllare e allo stesso tempo guidare la complessa sequenza di reazioni biochimiche che hanno luogo all'interfaccia osso-impianto in maniera da migliorare il processo di osteointegrazione.

Sono stati eseguiti molti studi al fine di trovare delle biomolecole specifiche con le quali arricchire la superficie implantare, così da migliorare la risposta in termini di osteointegrazione. Molte di queste molecole (es. fattori di crescita e proteine di adesione) sono normalmente presenti sulla membrana cellulare e nella matrice extracellulare o in entrambe [52, 53]. Ci sono tuttavia numerosi problemi relativi all'utilizzo delle intere proteine, prevalentemente legati alla bassa stabilità chimica di tali molecole, alla loro solubilità nell'ambiente biologico e al loro costo. Per questa ragione è stato proposto un approccio alternativo chiamato *mimetismo peptidico* (peptide-mimicry), che consiste nell'identificazione e nell'applicazione di sequenze proteiche biologicamente attive, note col nome di *peptidi bioattivi*, che risultano molto più stabili e solubili delle proteine intere e che possono essere sintetizzate in laboratorio a basso costo.

Esistono tre diversi metodi biochimici per modificare una superficie metallica: (1) semplice adsorbimento fisico-chimico della molecola attiva sulla superficie; (2) legame covalente, diretto oppure mediato da un carrier; (3) utilizzo di un materiale biocompatibile e biorisorbibile arricchito con la molecola attiva e applicazione di tale composto come rivestimento sulla superficie implantare.

SCOPO E FINALITÀ DELLA RICERCA

Il successo a lungo termine di un impianto è direttamente collegato alla quantità di tessuto osseo neoformato che aderisce alla sua superficie. La neo-osteogenesi ha luogo quando l'impianto si trova in una situazione di elevata stabilità, condizione fondamentale per ottenere una buona osteointegrazione.

Gli eventi che portano all'integrazione di un impianto nell'osso, determinanti per la buona riuscita di un intervento chirurgico di inserzione implantare, hanno luogo in massima parte a livello dell'interfaccia osso-impianto. Lo sviluppo dell'interfaccia è complesso e coinvolge molti fattori, tra i quali vi sono alcune caratteristiche dell'impianto (materiale, forma, topografia e composizione chimica), eventuale carico meccanico, tecnica chirurgica impiegata e variabili relative all'ospite, come la qualità e la quantità d'osso. Uno degli obiettivi attuali degli studi in campo implantologico è la ricerca di un design implantare ottimale al fine di ottenere una guarigione controllata e rapida. In particolare, oltre all'accelerazione del normale processo di guarigione della ferita, gli impianti dovrebbero favorire la formazione all'interfaccia di una matrice con struttura e caratteristiche simili a quelle dell'osso e con adeguate proprietà biomeccaniche. Questo consentirebbe non solo un più rapido recupero da parte del paziente ma anche una stabile fissazione tra osso e impianto, permettendo un più precoce caricamento di quest'ultimo [54].

La ricerca scientifica e la pratica clinica sembrano suggerire che la topografia della superficie implantare giochi un ruolo importante nel processo di guarigione.

In particolare evidenze cliniche hanno dimostrato che modificazioni nella topografia superficiale di impianti in titanio commercialmente puro (cpTi) portano ad una migliore risposta del tessuto osseo a seguito dell'inserzione implantare [55].

Ad oggi la rugosità è considerata un fattore cruciale nel promuovere l'integrazione di un impianto con il tessuto osseo [56] e nello stimolare il processo di guarigione peri-implantare [57, 58].

I soli valori dei parametri di rugosità non possono essere tuttavia sufficienti a spiegare le risposte biologiche del tessuto all'impianto [59]: alcuni autori sostengono che è la microtopografia e non la rugosità a rappresentare il parametro critico nel favorire i meccanismi di interazione su cui si basa l'osteointegrazione [60].

Con il presente studio s'intende indagare, mediante ricerche *in vitro* ed *in vivo*, il comportamento delle cellule e del tessuto osseo in risposta a superfici in titanio aventi differente topografia.

TECNICHE, MATERIALI E METODI
IMPIEGATI NELLA RICERCA

La presente ricerca è stata condotta in due fasi cronologicamente successive:

1. Esperimenti *in vitro*, relativi al comportamento di cellule della linea osteoblastica coltivate su placchette in titanio sottoposte a differenti trattamenti di superficie;
2. Esperimenti *in vivo*, relativi alla risposta del tessuto osseo a seguito dell'inserzione di impianti in titanio sottoposti agli stessi trattamenti di superficie eseguiti sulle placchette utilizzate *in vitro*.

1. ESPERIMENTI IN VITRO

Per le indagini *in vitro* sono stati usati sei gruppi di placchette in titanio (cpTi) aventi un'area di 10x10 mm e uno spessore di 3 mm. Ciascun gruppo di placchette è stato sottoposto ad un diverso trattamento al fine di modificarne la topografia di superficie:

- **SS** (smooth surface): superficie relativamente liscia, sottoposta esclusivamente ad un procedimento di turning;
- **TPS** (titanium plasma spray): superficie resa rugosa per deposizione di particelle di titanio mediante plasma spray;
- **Al-100**: superficie SLA, resa rugosa per detrazione di titanio mediante sand-blasting con particelle di Al₂O₃ aventi diametro di 100 µm e successiva mordenzatura acida;
- **Al-150**: superficie SLA, resa rugosa per detrazione di titanio mediante sand-blasting con particelle di Al₂O₃ (Ø = 150 µm) e successiva mordenzatura acida;
- **Zr-60**: superficie SLA, resa rugosa per detrazione di titanio mediante sand-blasting con particelle di zirconia (ZrO₂) aventi diametro di 60 µm e successiva mordenzatura acida;
- **Zr-120**: superficie SLA, resa rugosa per detrazione di titanio mediante sand-blasting con particelle di ZrO₂ (Ø = 120 µm) e successiva mordenzatura acida.

Le placchette sono state fornite in condizioni di sterilità dalla ditta Or-Vit (Castelmaggiore, Bologna). Alcune delle placchette sono state sottoposte ad analisi rugosimetrica, al fine di indagare la topografia di superficie dei diversi gruppi, prendendo in considerazione quattro parametri relativi alla rugosità:

R_a (rugosità media), che rappresenta la media aritmetica delle distanze picco-valle, espressa in µm;

R_t (range di rugosità), che rappresenta la massima distanza picco-valle, espresso in µm;

R_z , che rappresenta la media aritmetica dei cinque valori più elevati di distanza picco-valle, espresso in μm ;

R_q , deviazione standard dell'ampiezza delle altezze.

Altri campioni sono stati analizzati mediante spettroscopia micro-Raman per verificare la presenza sulle superfici di eventuali impurità, residui dei trattamenti per la modificazione della topografia superficiale.

Le placchette destinate a coltura di osteoblasti invece sono state collocate in piastre da ventiquattro pozzetti e successivamente sottoposte a semina cellulare.

Gli osteoblasti umani utilizzati negli esperimenti *in vitro* sono stati isolati da piccoli frammenti di tessuto osseo del corpo mandibolare di un individuo di 5 anni, prelevati durante un intervento chirurgico per la correzione di micrognazia previo consenso dei genitori.

Si è proceduto all'eliminazione del periostio con bisturi sterile al fine di ottenere dei campioni costituiti dal solo tessuto mineralizzato e i frammenti così ottenuti sono stati immersi in Phosphate Buffer Solution senza Ca^{2+} e Mg^{2+} (PBS, Sigma) e quindi sono stati posti su un agitatore meccanico per eliminare eventuali residui di sangue e tessuto midollare.

I campioni di tessuto, trasferiti in capsule petri contenenti Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GibcoBRL, Grand Island, NY) con aggiunta di siero bovino fetale (FBS, BioWhittaker, Usa) al 10%, penicillina G (100 U/ml) e streptomina (100 $\mu\text{g/ml}$) (Penstrep, GibcoBRL), sono stati mantenuti in atmosfera controllata in termostato a 37°C , con 5% di CO_2 . Il medium completo è stato rinnovato ogni 2-3 giorni.

Dopo circa 3 settimane ai bordi dei campioni si sono resi visibili i primi sproutings di cellule, che una volta raggiunta la confluenza hanno subito un processo di amplificazione: le cellule sono state lavate con PBS privo di calcio e magnesio, poi il buffer è stato aspirato e sostituito con tripsina (soluzione tripsina-EDTA 0.25%, Sigma), nella quantità di 2 ml di enzima per capsula petri. L'enzima è stato lasciato agire a 37°C fino ad ottenere il distacco delle cellule dalla superficie di coltura, risultato raggiungibile in media nel giro di circa 1 minuto e mezzo. L'azione della tripsina è stata quindi bloccata grazie all'aggiunta di 10 ml di medium di coltura contenente siero al 10%. Il medium con le cellule risospese è stato distribuito in altre piastre petri, in modo da avere l'amplificazione della coltura di partenza. Le popolazioni cellulari ottenute sono state caratterizzate valutando l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) e la produzione di osteocalcina, markers precoci di differenziamento osteoblastico, servendosi per la rivelazione di un saggio

enzimatico colorimetrico. Una popolazione di fibroblasti umani provenienti dalla cute è stata utilizzata come controllo negativo.

Al fine di valutare la capacità di adesione e l'attività proliferativa cellulare, alcuni campioni di osteoblasti sono stati seminati in capsule petri con DMEM addizionato di FBS al 20%, per consentirne l'adesione corretta grazie all'elevato contenuto di fibronectina. Raggiunta la confluenza gli osteoblasti sono stati amplificati fino ad ottenere due capsule petri con cellule a contatto e sono stati quindi tripsinizzati, risospesi e riseminati in piastre da ventiquattro pozzetti contenenti sul loro fondo le placchette di titanio precedentemente preparate. In ogni pozzetto sono state seminate circa 80000 cellule/ml, in DMEM con FBS al 10%. Nei pozzetti è stato inoltre aggiunto acido ascorbico, componente indispensabile all'espressione del fenotipo osteoblastico, in concentrazione di 250 μ M.

A 24 h dalla semina, tempo necessario alle cellule per aderire alle placchette, il medium è stato rimosso e sostituito con DMEM contenente FBS all'1%. L'utilizzo di FBS all'1% ha avuto lo scopo di ridurre l'attività proliferativa di base delle cellule, evidenziando così le eventuali differenze in termini di crescita.

Contemporaneamente due campioni (costituenti il Tempo 0) sono stati prelevati, lavati e staccati con 300 μ l di tripsina; dopo circa 2 minuti l'enzima è stato bloccato con 700 μ l di soluzione fisiologica (NaCl allo 0.9%) a 4°C. La soluzione è stata trasferita in provette contenenti ciascuna 9 ml di NaCl, ed il tutto è stato contato con un Coulter Counter (Coulter Electronics Limited, England). La stessa procedura è stata ripetuta a 6 e 12 giorni sugli altri campioni coltivati in FBS all'1%. L'esperimento è stato eseguito in doppio.

Alcuni campioni di cellule sono stati processati per la misurazione dell'attività della fosfatasi alcalina. Dopo 24 h dalla semina il medium è stato sostituito con DMEM contenente FBS all'1% e contemporaneamente si è provveduto alla processazione per la misura dell'attività della fosfatasi alcalina di due campioni che servissero da riferimento (Tempo 0). Le membrane cellulari di tali campioni sono state solubilizzate con 300 μ l di una soluzione di Triton 0.1% per 20 minuti (Triton-X100, Sigma) al fine di liberare l'enzima presente sulla membrana. Le cellule sono state poi congelate a -20° C e mantenute in tale stato fino alla lettura dei campioni. La stessa procedura è stata eseguita sui campioni coltivati in DMEM con FBS all'1%, a 6 e 12 giorni dalla semina. Per l'esecuzione del saggio i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente e si è proceduto a miscelare 100 μ l di estratto cellulare con 200 μ l di substrate buffer (Substrate

phosphatase, Sigma) e con 100 μ l di AMP buffer (Alkaline buffer solution, Sigma), quindi sono stati incubati a 37°C per circa 1 ora per permettere alla reazione enzimatica di avere luogo. Contemporaneamente è stata generata una curva standard di cromoforo p-Nitrofenolo (10 μ mol/ml, Sigma, diluito in rapporto 1:10 in reaction buffer per ottenere una concentrazione di 1 nmole/ μ l); è stata creata una serie di campioni standard contenenti 0, 10, 20, 40, 50, 100 nmoli di pNPP.

I preparati sono stati letti in assorbanza a 400 nm tramite spettrofotometro (Helios γ , Spectronic Unicam). L'attività media della fosfatasi alcalina ottenuta nei campioni in esame è stata espressa in pmol/minuto e corretta per il numero di cellule determinato in parallelo. Il rilevamento è avvenuto in doppio.

Tutte le procedure degli studi *in vitro* (relative a prelievo, coltura, analisi di proliferazione cellulare ed indagini enzimatiche) fin qui descritte sono state eseguite presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Istologia, dell'Università di Parma.

Alcuni campioni, infine, sono stati processati per l'osservazione al SEM a tempi scalari prefissati (24h, 6gg, 12gg). Le placchette sono state lavate delicatamente in PBS contenente calcio e magnesio, in modo da non favorire il distacco delle cellule. I campioni sono stati immersi per 10 minuti in fissativo Karnovsky modificato per cellule (1% paraformaldeide e 1.5% glutaraldeide in tampone cacodilato 0.1 M), poi sono stati effettuati 2 lavaggi da 5 minuti ciascuno con tampone cacodilato 0.1 M, è stata eseguita una post-fissazione di 20 minuti con tetrossido di Osmio (Os₂O₄) all'1 % e dopo altri due lavaggi da 5 minuti in tampone Cacodilato 0.1 M i campioni sono stati progressivamente disidratati attraverso la serie ascendente degli alcoli (50%, 70%, 80%, 95%, 100%) ripetendo il passaggio in ciascun alcool per due volte con gli stessi tempi (5 minuti/passaggio). I campioni sono stati quindi immersi in Esametildisilazano (Sigma) per due trattamenti da 5 minuti ciascuno, infine sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente sotto cappa, per la successiva osservazione al SEM.

2. ESPERIMENTI *IN VIVO*

Per le indagini *in vivo* sono stati utilizzati settantadue impianti conici a vite in titanio commerciale di grado 2 (ISO 5832-2), lunghi 8 mm e aventi un diametro esterno di 3.8 mm. Per modificarne la topografia di superficie, gli impianti sono stati sottoposti agli stessi trattamenti riservati alle placchette utilizzate negli studi *in vitro*, in modo da rendere

comparabili i risultati ottenuti nei due tipi di indagine. Sulla base dei dati ottenuti negli studi *in vitro*, tuttavia, è stata fatta una scelta preliminare dei tipi di superficie da testare *in vivo*, selezionando solo quelli che avevano dato i migliori risultati in termini di risposta cellulare (ovvero gli impianti sabbiati con zirconia):

- **Zr-60**: sottoposti a sand-blasting con particelle di ZrO₂ di 60 µm di diametro e a successiva mordenzatura acida;
- **Zr-120**: sottoposti a sand-blasting con particelle di ZrO₂ di 120 µm di diametro e a successiva mordenzatura acida.

Come controllo sono stati utilizzati impianti **SS**, con una superficie relativamente liscia modificata esclusivamente mediante turning.

Gli impianti sono stati forniti dalla ditta Or-Vit dopo essere stati sottoposti a sonicazione in soluzione detergente per 30 minuti e in acqua distillata per altri 20 minuti, per sgrassare e pulire la superficie da sostanze contaminanti eventualmente presenti e dopo essere stati sterilizzati mediante trattamento con raggi γ .

Alcuni impianti sono stati utilizzati per analisi sia riguardanti la topografia superficiale (analisi rugosimetrica – R_a, R_t, R_z) sia relative alla ricerca di eventuali sostanze contaminanti residue presenti sulla superficie (spettroscopia micro-Raman).

Gli studi *in vivo* sono stati eseguiti nel rispetto della legislazione italiana ed europea relativa alla sperimentazione animale, secondo i principi sanciti dalla “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” e dall’“Animal Welfare Assurance No A5424-01” redatto dal National Institute of Health (NIH – Rockville Maryland USA).

Nella presente ricerca sono state utilizzate sei pecore di circa 3 anni d’età e 70 Kg di peso, risultato dell’incrocio di due razze pure (Bergamasca e Massese). Gli impianti sono stati inseriti in diafisi tibiale, previa medicazione degli animali con un’iniezione intramuscolare di 10 mg/Kg di Ketamine (Ketavet, Farmaceutici Gellini Spa, Aprilia, Italy) e 0.3 mg/Kg di Xylazine (Rompun, Bayer Italia SPA, Italy) e un’iniezione sottocutanea di 0.0125 mg/Kg di atropina solfato. L’anestesia totale è stata indotta per somministrazione intravenosa di sodio tiopentone al 2.5% ed è stata mantenuta durante l’intervento con una miscela di O₂/NO₂ (rispettivamente 60% e 40%) contenente l’1.5-2% di isofluorano. La superficie mediale di ciascuna delle diafisi tibiali è stata esposta rimuovendo il periostio e in questa regione sono stati prodotti, con un trapano a bassa velocità raffreddato in soluzione fisiologica, sei fori di 3.9 mm di diametro, trasversali rispetto alla superficie dell’osso. Gli impianti sono stati inseriti in questi fori con un momento torsionale di inserzione pari a 1.6 ± 0.2 Nm (Torque wrench, CITIEFFE Srl,

Bologna, Italy). Nel periodo immediatamente successivo all'operazione agli animali sono stati somministrati antibiotici (1g/day di cefalosporina per 5 giorni) e analgesici (500 mg/day di ketoprofene per 3 giorni).

Gli animali sono stati in seguito sacrificati mediante eutanasia farmacologica a tempi scalari di 2 e 4 settimane. Le operazioni chirurgiche di inserzione e prelievo degli impianti sono state eseguite presso il Dipartimento di Chirurgia Sperimentale, Istituto di Ricerca Codivilla-Putti, degli Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna. Le tibie sono state recise e liberate dei tessuti molli circostanti e dalla regione mediale delle diafisi tibiali sono stati prelevati segmenti ossei di forma cilindrica contenenti un singolo impianto ciascuno. I cilindri d'osso sono stati fissati per 60 minuti in soluzione Karnovsky (paraformaldeide al 4% e glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato 0.1M), disidratati nella serie ascendente degli alcoli (50%, 70%, 80%, 95%, 100%) ripetendo per due volte il passaggio in ciascun alcool con gli stessi tempi (30 minuti sotto vuoto e 90 minuti sotto cappa a temperatura ambiente), immersi in xilolo fino a diafanizzazione del tessuto ed inclusi infine in una miscela di resina metilmetacrilato (Methylmethacrylate Monomer Stabilized, Merck, Darmstadt, Germany) contenente perossido di benzoile (Carlo Erba Reagenti, Rodano (MI), Italy) al 3.5%. A polimerizzazione avvenuta, attraverso un procedimento di taglio e lappatura (Saw and Grinding, Remet, Bologna, Italy), sono state ottenute da ciascun campione tre sezioni osso-impianto parallele all'asse longitudinale del dispositivo implantare: utilizzando una troncatrice a lama di diamante dai cilindri sono state ricavate sezioni di 100-200 μm di spessore (sawing); la superficie di taglio è stata poi levigata mediante lappatura con dischi in carburo di silicio a granulometria decrescente (grinding) ed infine lucidata utilizzando un panno microlap e della polvere di allumina con granuli di diametro compreso tra 1 e 3 micron.

Alcune delle sezioni così ottenute sono state incollate su appositi vetrini in plastica con una colla acrilica a base di metilmetacrilato (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) e sono state successivamente colorate con blu di toluidina e fucsina acida per poi essere osservate al microscopio ottico (BX41, Olympus Optical Co. Europa GmbH, Germany). Su questi campioni, oltre a valutazioni relative alla morfologia tissutale, sono state effettuate misurazioni morfometriche utilizzando un analizzatore di immagini con software dedicato (Qwin, Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, United Kingdom). Le misurazioni sono state eseguite in maniera semi-automatica su immagini prese ad un ingrandimento originario di 10x, relative alla porzione di impianto a contatto con l'osso corticale della diafisi tibiale, senza considerare la regione della punta

dell'impianto sporgente nel canale midollare. Su tali immagini sono stati valutati i seguenti parametri istomorfometrici:

- **Bone-to-Implant Contact (BIC, %)**, che rappresenta la percentuale di superficie implantare a diretto contatto con l'osso indipendentemente dallo spessore o dalla quantità di tessuto osseo presente nello spazio (gap) all'interfaccia osso-impianto. Sono stati misurati i valori di BIC relativi al tessuto osseo neoformato (BIC_{NEW}), al tessuto osseo ospite pre-esistente (BIC_{OLD}) e ad entrambi presi nella loro totalità (BIC_{TOT}).

- **Bone Ingrowth (BI, %)**, che indica la quantità percentuale di nuovo tessuto osseo cresciuto nel gap presente all'interfaccia tra osso e impianto. Il BI è stato misurato in un'area compresa tra il vertice e la base delle spire, indipendentemente dal diretto contatto tra tessuto osseo e superficie implantare.

- **Bone Surface (BS/BV, %)** che è dato dal rapporto tra il perimetro del tessuto osseo neoformato e l'area del nuovo osso, moltiplicato per una costante di correzione ($4/\pi$) relativa alle strutture isotropiche, indice della geometria del tessuto osseo neoformato.

Alcuni campioni inclusi in resina sono stati puliti con una pasta di diamante di grado 3-KD-C3 e sottoposti ad analisi microdurimetrica per valutare la durezza dell'osso (Microhardness VMHT 30, Leica, Wien, Austria). I valori di microdurezza sono stati ottenuti mediante il test di microdurimetria di Vickers, facendo le misurazioni tangenzialmente all'interfaccia e applicando all'osso un carico di 0.05 Kgf per 5 secondi. Il valore medio è stato calcolato su dieci misurazioni, eseguite per ciascuna area di osso neoformato esaminata entro 200 μm di distanza dall'interfaccia (HV200).

Altri campioni dopo il prelievo sono stati processati per l'osservazione al Microscopio Elettronico a Scansione: attraverso un procedimento di rimozione meccanica da ciascun cilindro d'osso è stato staccato il relativo impianto. Sia gli impianti che i relativi tessuti peri-implantari sono stati quindi fissati in soluzione Karnovsky (paraformaldeide al 4% e glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato 0.1M), disidratati nella serie ascendente degli alcoli (50%, 70%, 80%, 95%, 100%), immersi in Esametildisilazano (Sigma) e lasciati infine asciugare sotto cappa a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi montati sugli stubs con un film bioadesivo al carbonio e ricoperti con un coating di oro/palladio (circa 30 nm) per essere infine osservati al SEM (Philips 515 Scanning Electron Microscope, Philips, Eindhoven, Holland) attraverso una sonda per gli elettroni secondari ad un voltaggio di 15 kV.

Alcuni campioni, infine, sono stati processati per l'osservazione al Microscopio Elettronico a Trasmissione: dopo essere stati fissati con soluzione Karnovsky, i campioni

sono stati post-fissati in tetrossido di osmio all'1% (Sigma), disidratati nella serie ascendente degli alcoli e inclusi in resina araldite. Da questi campioni sono state ottenute delle sezioni fini che sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo per essere quindi osservate al TEM (Philips CM-10 Electron Microscope, Philips, Eindhoven, Holland).

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un software dedicato (SPSS v.12.1, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). I dati sono stati riportati come valore medio \pm deviazione standard (DS) ad un livello di significatività con $p < 0.05$. Dopo aver verificato la distribuzione normale e l'omogeneità della varianza, per analizzare e comparare tra loro i dati istomorfometrici e quelli microdurimetrici relativi alle diverse superfici sono stati utilizzati il test ANOVA e il test a comparazione multipla di Scheffé. Per confrontare i dati istomorfometrici e microdurimetrici relativi a ciascuna superficie nei diversi tempi sperimentali è stato utilizzato il test del t di Student.

RISULTATI

1. ESPERIMENTI *IN VITRO*

I risultati dell'analisi rugosimetrica hanno mostrato evidenti differenze nella rugosità di superficie delle placchette: come prevedibile, il campione SS è risultato essere quello meno rugoso ($R_a = 0.56 \mu\text{m}$; $R_t = 5.78 \mu\text{m}$), mentre quello TPS aveva i valori più elevati di R_a ed R_t (rispettivamente $9.5 \mu\text{m}$ e $59.9 \mu\text{m}$). Tra i rimanenti campioni, Al-100 è risultato essere quello con rugosità più pronunciata ($R_a = 1.98 \mu\text{m}$; $R_t = 19.04 \mu\text{m}$), mentre nelle altre placchette i valori di R_a oscillavano tra $1.14 \mu\text{m}$ (Al-150) e $1.52 \mu\text{m}$ (Zr-60) e quelli di R_t erano compresi tra $8.76 \mu\text{m}$ (Zr-120) e $12.06 \mu\text{m}$ (Zr-60). L'analisi della distribuzione delle irregolarità, espressa da R_q , ha consentito di individuare due gruppi di placchette: nel primo, comprendente TPS, Zr-60 e Al-100, le irregolarità erano distribuite su tutta la superficie in maniera disomogenea ($R_q > 2$), mentre nel secondo gruppo (SS, Zr-120 e Al-150) i campioni avevano una superficie più regolare ($R_q < 2$). Le placchette SLA e SS rappresentano i due casi limite, poiché hanno mostrato rispettivamente la maggiore e minore omogeneità nella distribuzione delle irregolarità superficiali.

Al fine di verificare l'eventuale presenza di impurità sulla superficie delle placchette, per ciascun tipo di campione sono stati registrati cinquanta spettri micro-Raman. La superficie SS si è rivelata priva di impurità, mentre gli altri campioni, in particolare quelli sottoposti a sand-blasting con zirconia, presentavano granuli di varia natura sulla loro superficie: sulle placchette Zr-60 sono state ritrovate particelle di ZrO_2 nella sua modificazione polimorfica monoclinica, impurità ricollegabili a silicati vetrosi e tracce di TiO_2 nella sua modificazione polimorfica del rutilio, la cui presenza indica che si è verificata l'ossidazione del titanio. Poiché il rutilio è stato osservato in uno solo dei numerosi punti analizzati si può ipotizzare che il processo di ossidazione sia stato limitato. Lo stesso processo è apparso in maniera più consistente sulle superfici TPS: l'analisi micro-Raman ha rivelato la presenza di TiO_2 nella modificazione polimorfica del rutilio in molti punti. Impurità di zirconia monoclinica e di silicati vetrosi sono state riscontrate anche sulle placchette Zr-120, ma su queste ultime non c'era alcuna traccia di rutilio.

Dall'analisi di diversi punti sulle placchette Al-100 e Al-150 risulta evidente in entrambe la presenza di allumina nella sua forma polimorfica di corindone ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) e sulle placchette Al-100 è stato rilevato TiO_2 -rutilio in uno dei numerosi punti esaminati.

L'analisi al SEM ha consentito di indagare le caratteristiche morfologiche delle diverse superfici.

La Figura 1a mostra la superficie di una placchetta SS, caratterizzata da irregolarità piuttosto evidenti che si presentano sotto forma di solchi profondi lasciati sulla superficie dalle procedure di polishing, orientati parallelamente tra loro e aventi un'ampiezza presumibile dell'ordine di qualche decimo di micron. A questi solchi si aggiungono piccole irregolarità puntiformi, ma la superficie si può considerare complessivamente abbastanza omogenea ed uniforme.

La superficie osservabile in Figura 1b, relativa ad una placchetta di tipo TPS, è caratterizzata da un'irregolarità molto marcata, una vera e propria anfrattuosità, con sporgenze dal profilo frastagliato e cavità profonde.

Nelle Figure 1c e 1d vengono messi a confronto i due campioni sottoposti a sand-blasting con ZrO_2 . Questi, al contrario di quanto osservato nel campione TPS, esibiscono una superficie molto omogenea, dove il processo di sand-blasting ha portato alla formazione di piccole cavità rotondeggianti distribuite in maniera uniforme, irregolarità che potrebbero essere definite "a colpo d'unghia", disperse in una superficie che per il resto appare piuttosto piana. Tali irregolarità si ritrovano più fittamente concentrate nel campione sabbiato con particelle di granulometria maggiore (Zr-120).

Profondamente diverso è l'aspetto delle placchette sabbiate con allumina che, come è evidente nelle Figure 1e ed 1f, si distinguono per una superficie aspra caratterizzata dalla presenza di cavità irregolari e creste metalliche aguzze e con un notevole sovvertimento della tessitura superficiale liscia di partenza. Spicole metalliche si alternano a piccoli crateri dai bordi alquanto frastagliati.

La Figura 2a mostra un campione SS dopo 12 giorni di coltura. E' evidente un tappeto piuttosto continuo di cellule che hanno quasi raggiunto la confluenza. Il loro aspetto è allungato e regolare, e si presentano con una densità decisamente maggiore rispetto a quella osservabile a parità di tempo sulle placchette di tipo TPS (Figura 2b). Nei campioni TPS a 12 giorni dalla semina le cellule appaiono rade, ben lontane dalla confluenza e si presentano irregolari, tese a formare ponti intercellulari tra una sporgenza e l'altra del titanio. Le cellule cresciute sulle placchette TPS non hanno colonizzato le anfrattuosità del titanio, ma si sono limitate a distendersi sul metallo mostrando oltretutto uno scarso grado d'adesione alla superficie.

La situazione si presenta radicalmente differente quando si analizzano i campioni sottoposti a sand-blasting. Nel caso delle placchette sabbiate con zirconia, come evidente nelle Figure 3a e 3b, dopo 12 giorni di coltura le cellule sono giunte a confluenza piena formando un tappeto continuo e compatto. Le cellule cresciute su queste superfici si

presentano abbastanza grandi e di forma regolare, appaiono distese e mostrano un percettibile orientamento di crescita.

I campioni trattati con allumina osservati a 12 giorni dalla semina, rappresentati nelle Figure 4a e 4b, rivelano una più bassa densità cellulare ma soprattutto una maggiore irregolarità nel pattern di distribuzione delle cellule. L'orientamento, infatti, è solo grossolanamente percepibile e le cellule si presentano poliedriche: a volte sono stirate, allungate e strette, talora invece appaiono più allargate, grandi e dai contorni spesso dentellati. Lo spazio intercellulare risulta essere abbastanza ampio e tra una cellula e l'altra è sempre possibile intravedere il titanio sottostante. Non si ha mai l'impressione di fusione dei citoplasmi in un tutt'uno, come osservato per le cellule coltivate su placchette sabbiate con zirconia.

L'analisi della crescita cellulare e dell'attività enzimatica degli osteoblasti è stata riassunta in una serie di grafici (Figura 5) che mettono a confronto a 1, 6 e 12 giorni dalla semina il numero di cellule, diretta funzione della vitalità e della capacità proliferativa cellulare, con l'attività enzimatica, specchio di una maggiore funzionalità metabolica specifica del fenotipo osteoblastico, plausibilmente in relazione con l'attività osteosintetica di queste cellule *in vivo*.

Il numero di cellule presenti dopo un giorno sui campioni SS si è rivelato decisamente più basso rispetto a quello calcolato al momento della semina: circa 40000 cellule per placchetta (Figura 5a). In tempi successivi è stato possibile osservare una crescita abbastanza omogenea, piuttosto lenta nei primi giorni (tra semina e giorno 6), senza che le cellule arrivassero però nemmeno a raddoppiare il proprio numero. Nella seconda settimana il numero degli osteoblasti si è mantenuto sostanzialmente costante, perfino lievemente in diminuzione. L'attività fosfatasica non ha subito variazioni rilevanti; si può altresì notare una lieve diminuzione dell'attività enzimatica nella prima settimana in corrispondenza del picco proliferativo, e un altrettanto lieve recupero nella fase di quiescenza proliferativa susseguente, nel corso della seconda settimana di coltura.

La Figura 5b illustra l'andamento della crescita cellulare sulle placchette TPS. Dopo 1 giorno le cellule hanno raggiunto una densità di circa 24000 per placchetta e nel corso dei 12 giorni dell'esperimento hanno mostrato un andamento costante di crescita, che tuttavia è apparsa lenta e scarsa: le cellule infatti sono riuscite a raddoppiare il proprio numero, ma questo è rimasto in ogni modo molto basso, attorno alle 50000 cellule per placchetta; a questa crescita peraltro non ha fatto seguito un contemporaneo incremento dei livelli di

fosfatasi alcalina, che si è mantenuta costante attorno a livelli base di 10000 pmoli/minuto.

Il numero di cellule adese alla superficie delle placchette Zr-60 dopo 1 giorno è risultato essere all'incirca lo stesso osservato sui campioni SS, ma nel caso del campione sabbaiato le cellule sono drasticamente aumentate già dopo i primissimi giorni, mantenendosi poi di numero pressoché costante durante tutto il periodo dell'esperimento fino a raggiungere al termine dei 12 giorni un valore più che doppio rispetto a quello di partenza, attorno alle 120000 cellule/placchetta (Figura 5c). Il dato sicuramente più eclatante riguarda però l'attività fosfatasi: dopo un periodo di quiescenza nella prima settimana, durante la quale il valore dell'attività enzimatica è rimasto fondamentalmente piuttosto basso, tale parametro ha subito un incremento molto marcato. La ripidità della curva relativa alla fosfatasi appare maggiore di quella relativa al numero di cellule, segno di un globale aumento dell'attività enzimatica per cellula.

Nelle placchette Zr-120 l'andamento della curva di crescita cellulare è apparso radicalmente differente da quello relativo ai campioni Zr-60, e lo stesso si può dire dell'attività enzimatica (Figura 5d). Già dopo 1 giorno l'adesione delle cellule alle placchette Zr-120 si è rivelata nettamente superiore sia rispetto al caso delle superfici SS che a quello delle superfici Zr-60, ma tale parametro non ha mostrato alcun incremento nei giorni successivi. Questo comportamento si è mantenuto costante fino al sesto giorno, quando è stato possibile osservare una tardiva ripresa dell'attività proliferativa, che è risultata molto intensa arrivando fino quasi a raddoppiare il numero di cellule per placchetta.

L'andamento dell'attività fosfatasi nei campioni Zr-60 ha seguito in maniera speculare quello della curva di crescita, partendo da un livello basale analogo a quello dei campioni SS e poi incrementando il proprio valore a partire dalla sesta giornata, a testimonianza del mantenimento dell'attività metabolica cellulare durante tutto il processo proliferativo.

Le curve in Figura 5e, relative ai campioni Al-100, mostrano un andamento analogo a quello osservato nel caso dei campioni Zr-60, anche se con alcune significative differenze. Il numero iniziale di cellule adese alla superficie delle placchette Al-100 è risultato essere decisamente basso, inferiore persino al numero osservato sulle placchette SS, ma tale valore ha subito una sensibile crescita nelle due settimane successive, con un incremento lievemente inferiore nella seconda settimana ma che può considerarsi complessivamente costante nel tempo, fino a raggiungere un livello di circa 100000 cellule per placchetta, valore doppio rispetto a quello iniziale.

L'attività enzimatica è rimasta molto bassa durante i primi 6 giorni, aumentando decisamente nei giorni successivi fino a raggiungere valori paragonabili a quelli relativi ai campioni Zr-120.

Il numero di cellule presenti dopo 1 giorno di coltura sulle superfici dei campioni Al-150 è risultato essere di circa 50000 per placchetta (Figura 5f), in linea con i valori dei campioni Al-100, ma in questo caso le cellule hanno proliferato in maniera costante per tutta la successiva durata dell'esperimento, raddoppiando il loro numero iniziale.

La fosfatasi alcalina nei campioni Al-150 è rimasta a livelli molto bassi: pressoché costante nella prima settimana, ha subito un lieve incremento solo nei giorni successivi mantenendosi però sempre su valori inferiori a quelli di tutti gli altri campioni esaminati.

2. ESPERIMENTI *IN VIVO*

Gli impianti utilizzati negli studi *in vivo* (SS, Zr-60 e Zr-120) sono stati osservati al Microscopio Elettronico a Scansione (Figura 6) per valutazioni morfologiche preliminari. Come ci si poteva aspettare, la topografia di superficie di tali campioni è risultata del tutto analoga a quella delle corrispondenti placchette utilizzate negli studi *in vitro*.

L'analisi al microscopio ottico dei campioni prelevati a 2 settimane ha rivelato, per tutti i tipi d'impianto, una buona risposta in termini di guarigione nella regione peri-implantare. In tutti i casi analizzati la maggior parte della superficie dell'impianto risultava immersa nella regione corticale tibiale mentre l'apice implantare protrudeva nel midollo osseo del canale midollare (Figura 7).

Attorno a tutti gli impianti è stata rilevata la presenza di alcune schegge di osso provenienti dal tessuto osseo ospite, probabilmente originate dalla frizione durante la maschiatura. Nella maggioranza dei casi le spire sono apparse ben ancorate nell'osso ospite, facendo pensare ad una situazione di buona stabilità primaria dell'impianto. Nelle regioni di diretto contatto dell'osso ospite con la superficie implantare non è stato rilevato tessuto osseo di nuova formazione, mentre trabecole di nuovo osso del tipo a fibre intrecciate sono state osservate nella regione peri-implantare compresa tra due spire adiacenti, laddove lo spazio all'interfaccia osso-impianto era dell'ordine di 250-350 μm . Tali trabecole ossee apparivano sottili e ricche di grandi osteociti situati in ampie lacune

ossee; sulla loro superficie erano inoltre presenti osteoblasti rotondeggianti disposti parallelamente e presumibilmente impegnati nella produzione di tessuto osteoide.

Nel gap peri-implantare di campioni SS è stato possibile apprezzare la presenza di sottili trabecole ossee neoformate che dal tessuto osseo ospite si dirigevano verso la superficie implantare, a volte ancorandosi su quest'ultima (Figura 8a). Le trabecole andavano a circondare vasi sanguigni di diverso calibro dispersi nelle lacune midollari ricche di cellule mesenchimali.

Attorno agli impianti Zr-60 e Zr-120, invece, le trabecole ossee neoformate oltre che dal tessuto osseo ospite sembravano originarsi anche direttamente dalla superficie implantare, senza alcuna interposizione di tessuto connettivo (Figure 8b e 8c). Queste trabecole apparivano disposte a formare un network tridimensionale di tessuto osseo intorno ai vasi sanguigni di grosso calibro negli spazi midollari.

Le osservazioni istologiche sui campioni prelevati a 4 settimane dall'inserzione hanno evidenziato attorno a tutti gli impianti la presenza di tessuto osseo neoformato organizzato in un network tridimensionale di trabecole ad andamento regolare, che delimitavano ben definite lacune midollari esattamente corrispondenti a quelle presenti nei campioni a 2 settimane. Le trabecole ossee neoformate sono apparse più sviluppate di quelle presenti dopo 2 settimane ed è stato possibile apprezzare una maggior quantità di trabecole a fibre intrecciate in diretto contatto con la superficie implantare; queste ultime avevano maggior spessore, soprattutto intorno agli impianti sabbiati con zirconia, grazie ad una progressiva deposizione di tessuto osseo lamellare a fibre parallele (Figura 9). Alcune schegge di tessuto osseo originate per frizione durante il processo di preparazione del letto implantare sono state parzialmente o totalmente inglobate dalle trabecole di tessuto osseo neoformato. In alcune aree degli impianti sabbiati il tessuto osseo a fibre intrecciate si presentava parzialmente sostituito da tessuto osseo lamellare, non solo a contatto con il tessuto osseo pre-esistente ma anche in prossimità della superficie implantare.

Per quanto riguarda l'analisi istomorfometrica (Tabella 1), a 2 settimane dall'inserzione i migliori risultati in termini di BIC_{NEW} sono stati ottenuti negli impianti Zr-60 (19.8 ± 1.8), seguiti dagli impianti SS (18.0 ± 1.2) e Zr-120 (17.5 ± 1.0); invece i valori più alti sia di BIC_{OLD} che di BIC_{TOT} sono stati osservati negli impianti Zr-120 (rispettivamente 22.4 ± 7.0 e 39.9 ± 7.7). I valori più alti relativi a BI sono stati riscontrati negli impianti Zr-60 (28.9 ± 2.7), seguiti dai Zr-120 (22.5 ± 2.4) e dagli SS (21.7 ± 2.4). I risultati migliori per quel che riguarda il rapporto BS/BV sono stati ottenuti negli impianti Zr-60 (23.2 ± 2.4).

I risultati istomorfometrici relativi ai campioni prelevati a 4 settimane hanno indicato negli impianti Zr-60 quelli con i valori più elevati di BIC_{NEW} (32.2 ± 1.3), seguiti dagli impianti SS (23.4 ± 1.8) e dai Zr-120 (19.2 ± 1.9). Sempre negli impianti Zr-60 sono stati ottenuti sia il valore più basso di BIC_{OLD} che quello più alto di BIC_{TOT} (rispettivamente 10.8 ± 1.1 e 43.0 ± 6.9). Il valore medio più elevato di BI è stato riscontrato negli impianti sabbiati, con un risultato migliore per Zr-60 (43.0 ± 2.4). Anche per quel che riguarda il rapporto BS/BV i risultati migliori sono stati osservati negli impianti sand-blasted, ma in questo caso il valore più elevato è stato misurato nei campioni Zr-120 (13.9 ± 1.1).

I risultati del test microdurimetrico (Tabella 2) indicano che a 2 settimane dall'inserzione il nuovo tessuto osseo maggiormente mineralizzato, valutato ad una distanza di 200 μ m dalla superficie implantare (HV200), è quello cresciuto attorno agli impianti Zr-60.

A 4 settimane dall'inserzione invece la mineralizzazione del tessuto peri-implantare valutata in termini di HV200 è stata parimenti più elevata attorno agli impianti Zr-60 (46.3 ± 1.8) e SS (46.4 ± 1.3).

Le osservazioni al SEM e al TEM delle varie superfici implantari distaccate dal tessuto osseo ospite confermano i dati ottenuti dalle analisi al MO. In particolare su alcune aree degli impianti Zr-60 e Zr-120 è stato possibile rilevare la presenza di trabecole ossee saldamente ancorate alla superficie metallica che a 1 mese si presentavano organizzate in un network tridimensionale di osso lamellare maturo ad andamento regolare (Figura 10). Nel caso delle superfici SS, invece, sono state osservate pochissime trabecole ossee a diretto contatto con la superficie implantare e dopo 1 mese era ancora rilevabile una forte discontinuità tra superficie implantare e osso neoformato nel gap (Figura 11).

Sulla superficie delle trabecole ossee, infine, sono state osservate al TEM numerose cellule arrotondate simil-osteoblastiche in intensa attività di deposizione, con un reticolo endoplasmatico molto sviluppato e con numerosi prolungamenti cellulari (Figura 12).

DISCUSSIONE

I risultati degli studi *in vitro* confermano i dati riportati da numerosi autori [61-65] relativi all'influenza esercitata dal trattamento di superficie sulla crescita degli osteoblasti, sia dal punto di vista morfologico che cinetico. Per avere un quadro complessivo degli effetti della topografia superficiale sul comportamento delle cellule occorre considerare in parallelo i risultati dei diversi studi eseguiti (crescita cellulare, morfologia delle colture, attività della fosfatasi alcalina).

Le curve di crescita rappresentano un dato molto importante per valutare la risposta delle cellule alle diverse superfici: la crescita cellulare è infatti il primo parametro a subire alterazioni nel caso in cui le cellule si vengano a trovare a contatto con una superficie dalla biocompatibilità non ottimale; d'altra parte il primo passo verso la rigenerazione tissutale è costituito proprio dalla replicazione e dalla crescita cellulare.

Negli esperimenti *in vitro* del presente studio la prima misurazione del numero di cellule è stata eseguita a 24 ore dalla semina, in quanto il rilevamento del numero di cellule a tempi così brevi è indicativo dell'adesione iniziale delle stesse al titanio. L'aumento della rugosità superficiale non determina *ipso facto* un aumento dell'adesione cellulare, come si potrebbe genericamente pensare: è sicuramente vero che i campioni a superficie liscia hanno mostrato da questo punto di vista una performance scarsa, ma i risultati sulle placchette TPS, che presentavano la rugosità più accentuata tra tutti i tipi esaminati, sono stati ancora più deludenti. Nei campioni sabbiati con zirconia sono stati osservati i valori di adesione più elevati, cosa evidente in particolar modo nel caso delle placchette Zr-120, che mostravano sulla superficie delle cavità rotondeggianti con forma, margini e dimensioni abbastanza regolari. Non altrettanto soddisfacenti sono stati i risultati relativi ai campioni sabbiati con allumina, con un profilo superficiale molto più aspro ed accidentato; su di essi l'adesione cellulare si è rivelata inferiore anche del 50%.

L'adesione non sembra pertanto essere espressione di una mera ritenzione meccanica delle cellule nelle asperità create sul substrato di coltura, quanto piuttosto un attecchimento preferenziale delle cellule sui tipi di superficie che meglio rispondono alle loro esigenze o che più verosimilmente riproducono una condizione di crescita fisiologica. Probabilmente alcuni tipi di superficie consentono alle cellule di instaurare un più elevato o un più efficace numero di giunzioni e adesioni focali con il substrato, così da determinare una migliore adesione. Va sottolineato che l'adesione è un fattore di primaria importanza per le cellule, una condizione fondamentale: solamente le cellule ematiche, che vivono in una matrice extracellulare liquida, non contraggono alcun tipo di

adesione con l'ambiente circostante; le cellule integrate in tessuti solidi, invece, hanno bisogno di tale intimo contatto con la matrice per sopravvivere, proliferare ed essere metabolicamente attive. E' stato dimostrato che attraverso l'adesione mediata dalle integrine vengono trasmessi al citoscheletro dei segnali proliferativi, trasportati poi direttamente al nucleo cellulare tramite i filamenti actinici [66]. Il termine adesione non indica perciò solo capacità delle cellule di resistere *in loco*, ma rappresenta anche il presupposto per la loro proliferazione. Queste osservazioni inoltre consentono di spiegare il comportamento delle cellule in coltura sulle placchette analizzate negli studi *in vitro*.

Il campione TPS ha mostrato una performance inferiore rispetto a tutti altri campioni, con cellule sempre scarse e poco adese, e non stupisce che i livelli di attività enzimatica sulle superfici TPS siano sempre estremamente bassi, pressoché ai limiti di sensibilità del test utilizzato per il rilevamento.

La fosfatasi alcalina è un indice di differenziamento degli osteoblasti, è un enzima espresso da cellule mature [67] ed è noto che gli osteoblasti per arrivare ad avere questo fenotipo maturo necessitano di specifiche condizioni di densità cellulare, tra cui il raggiungimento della confluenza. Una volta giunte a pieno contatto reciproco, le cellule comunicano tra loro tramite gap-junctions, scambiandosi quei segnali che porteranno all'attivazione di una mirata sintesi proteica [68]. La condizione di confluenza, nel corso delle 2 settimane di coltura, non è stata mai raggiunta nel caso di cellule seminate su placchette TPS. La piena confluenza cellulare è stata invece ottenuta su tutti i campioni trattati con ZrO_2 , ove i livelli di attività enzimatica hanno subito un poderoso incremento nel corso della seconda settimana di coltura, parallelamente ad un aumento piuttosto marcato nel numero di cellule. L'incremento nella quantità di cellule se considerato da solo non giustifica tuttavia gli aumentati livelli di fosfatasi: sul campione Zr-60 si è osservata una vera e propria "accensione" metabolica delle cellule, che hanno iniziato a produrre considerevoli quantità di enzima; dal lato opposto sul campione Al-150 nonostante la sensibile crescita cellulare non si è verificato un incremento particolarmente significativo nell'espressione enzimatica.

Alcuni autori [69] hanno ipotizzato che una contaminazione da residui di Al_2O_3 possa essere responsabile di una eventuale tossicità cellulare sulle superfici di placchette in titanio trattate con allumina. Ciò non è direttamente deducibile dai dati ottenuti nel presente studio; la crescita cellulare valutata esclusivamente attraverso il numero di cellule sembra anzi essere abbastanza buona anche sui campioni sabbiati con allumina, nonostante l'iniziale scarsa adesione. Occorre considerare d'altro canto la morfologia

cellulare su queste superfici, che dalle osservazioni al SEM è apparsa alquanto differente da quella di cellule cresciute su superfici Zr-60 e Zr-120: il tappeto cellulare sui campioni sabbiati con allumina è apparso più rado e discontinuo, più irregolare, meno disteso e perfino più sofferente, mentre le cellule sui campioni sabbiati con zirconia si sono rivelate ben confluenti ed orientate a formare strutture quali fasci e noduli cellulari. Questo dato suggerisce dunque una preferenza netta delle cellule della linea osteoblastica per le superfici trattate con Zr_2O_3 .

Riassumendo, il trattamento meno idoneo alla crescita delle cellule è risultato essere il plasma spray, e questo dato si può ricondurre in parte al probabile contenuto in residui di allumina delle superfici TPS ed in parte alla loro estrema rugosità, con una risultante crescita cellulare abbastanza stentata e difficoltosa. La morfologia delle cellule coltivate su placchette a superficie liscia si è rivelata normale, ma l'adesione e la crescita sono state piuttosto scarse, con bassissimi livelli enzimatici. Fra le rimanenti superfici trattate, le prestazioni dei campioni sabbiati con zirconia sono apparse superiori a quelle dei campioni sottoposti a sand-blasting con allumina, tanto per quel che riguarda l'aspetto del tappeto cellulare quanto per l'adesione, la crescita e l'attività metabolica delle cellule. All'interno del gruppo di campioni sabbiati con zirconia, le superfici Zr-60 sono quelle che hanno mostrato probabilmente la miglior combinazione fra crescita e differenziamento cellulare, come è chiaramente evidente in Tabella 3, dove ad ogni caratteristica delle diverse superfici (adesione, crescita, attività enzimatica, morfologia) è stato attribuito un punteggio, da 1 a 4, in modo da poter ottenere un facile ed immediato confronto.

In base ai risultati degli studi *in vitro*, come già detto, nella sperimentazione *in vivo* ci si è orientati esclusivamente sull'analisi di impianti sabbiati con zirconia, utilizzando come controllo impianti SS. Lo scopo di questa seconda fase di studio è stato quello di verificare se e in che grado la microtopografia di superficie potesse influire sulla risposta osteogenetica in termini di quantità e qualità del nuovo tessuto osseo.

Le indagini *in vivo* sono state limitate ai tempi brevi, ovvero a 2 e a 4 settimane dall'intervento, poiché in studi precedenti [70] eseguiti confrontando il tessuto osseo cresciuto attorno ad impianti SS e SLA prelevati a 6 e a 12 settimane dall'inserzione non sono state rilevate sostanziali differenze nel pattern dell'osso e nelle componenti tissutali. Tutti gli impianti analizzati hanno mostrato di aver raggiunto già a 2 settimane dall'inserzione una buona fissazione biologica, rilevabile grazie alla presenza a livello del gap osso-impianto di tessuto osseo neformato del tipo a fibre intrecciate organizzato in

sottili trabecole. Entrambe le superfici sabbiare con zirconia hanno mostrato un'osteogenesi peri-implantare più completa di quella osservabile negli impianti SS, poiché su tali superfici si è verificato un livello elevato e addirittura in molti casi prevalente di osteogenesi a contatto, apprezzabile per la presenza di trabecole ossee cresciute a partire dalla superficie metallica [71]. Sulle placchette SS, invece, la presenza di trabecole ancorate per lo più esclusivamente all'osso ospite consente di ipotizzare che si sia verificata soltanto un'osteogenesi a distanza, o che in ogni caso l'osteogenesi a contatto sia stata molto scarsa. Il tessuto osseo a fibre intrecciate riscontrabile a 2 settimane è apparso ricco di osteoblasti rotondeggianti e di osteociti localizzati in ampie lacune, facendo supporre che si fosse verificata una osteogenesi di tipo statico [72]. A 4 settimane dall'inserzione si è osservato un incremento nello spessore delle trabecole ossee a fibre intrecciate in particolar modo attorno agli impianti sabbiati con zirconia, grazie ad una progressiva deposizione di tessuto osseo a fibre parallele, indice dello sviluppo di una osteogenesi dinamica [72]. L'osso trabecolare a fibre intrecciate è il tipo di tessuto calcificato in grado di riempire il gap osso-impianto più velocemente e in maniera più uniforme e rappresenta un importante supporto per garantire stabilità e consentire un più precoce caricamento dell'impianto [73-75]. È probabile che a 2 settimane dall'inserzione gli impianti abbiano già raggiunto un buon livello di integrazione biologica, tale da consentirne un reale caricamento funzionale.

In alcuni studi relativi a tempi precoci di guarigione eseguiti su mascella di mini-pigs [76], i valori della torque di estrazione di impianti SLA sono risultati maggiori di quelli relativi ad impianti SS, mantenendosi tuttavia costanti nel tempo (4, 8 e 12 settimane). Le osservazioni relative all'ultrastruttura hanno confermato che una diretta deposizione d'osso e una adesione cellulare più evidenti negli impianti SLA piuttosto che negli SS. Da altri studi è emerso che gli osteoblasti si ancorano alla superficie di impianti SLA già ad un giorno dall'inserzione, depositando sulla superficie stessa proteine specifiche del tessuto osseo [77]. A livello della superficie implantare sono stati inoltre osservati da numerosi autori [54, 77-81] cristalliti aghiformi di fosfato di calcio distribuiti lungo una linea di mineralizzazione che ricorda le linee incrementali presenti nell'osso o nel cemento della radice. Queste osservazioni suggeriscono che la topografia superficiale ideale di un impianto dovrebbe avere caratteristiche il più possibile simili a quelle "naturali" della superficie di un osso calcificato, che le consentirebbero di svolgere una miglior attività di "stampo" (scaffold) per la crescita di nuovo osso, creando una situazione di maggior continuità all'interfaccia. La superficie Zr-60 analizzata in questo

studio possiede concavità regolari di 10-15 μm di diametro, con una distanza picco-valle di 12.06 μm . E' stato dimostrato che superfici con una rugosità moderata favoriscono la crescita di tessuto osseo nella regione peri-implantare più di quanto non facciano superfici lisce da una parte o eccessivamente rugose dall'altra [82]. Dai risultati del presente studio emerge che le cavità di profondità modesta e molto simili alle lacune osteocitarie presenti sulle superfici degli impianti Zr-60 possono agire su scala microscopica come uno scaffold nei confronti delle cellule mesenchimali o simil-osteoblastiche, favorendone l'adesione all'impianto.

I valori di BIC_{TOT} misurati a 2 settimane dall'inserzione si sono rivelati simili in tutte le superfici analizzate. Il valore relativamente più elevato osservato in Zr-120 è risultato collegato ad un altrettanto maggior valore di BIC_{OLD} . A 4 settimane dall'inserzione nei campioni Zr-60 sono stati riscontrati i valori di BIC_{TOT} più alti, risultato legato all'elevata quantità di nuovo osso a contatto con l'impianto (BIC_{NEW}). Il parametro morfometrico BIC_{NEW} è stato utilizzato per meglio quantificare il grado di osteogenesi peri-implantare in relazione ai diversi impianti analizzati (Zr-60>SS>Zr-120). Tale parametro fornisce un'indicazione della percentuale di superficie dell'impianto compresa nella corticale che è stata ricoperta da tessuto osseo neoformato [75, 83, 84], indipendentemente dalla qualità o dalla quantità del nuovo tessuto osseo cresciuto nel gap. Questo parametro specifico è importante poiché mostra meglio di altri il vero grado di integrazione biologica dell'impianto, cioè il tessuto osseo neoformato legato alla superficie implantare. Il decremento di BIC_{OLD} che è stato osservato negli impianti Zr-60 passando dalle 2 alle 4 settimane dopo l'intervento, più elevato e significativo rispetto a quello riscontrato negli altri due tipi analizzati, suggerisce che attorno ad impianti Zr-60 sia avvenuto il maggior grado di riassorbimento del tessuto osseo ospite, o in altre parole in questo tipo di impianti si è verificato un turnover osseo peri-implantare più sviluppato. In letteratura è stato spesso riportato che il contatto diretto osso-impianto sia un fattore di per sé sufficiente per valutare il grado di fissazione precoce di un impianto. Le osservazioni del presente studio sembrano suggerire invece che prendere in esame il solo BIC (BIC_{TOT} e/o BIC_{NEW}) non sia necessariamente sufficiente a dimostrare un ancoraggio dell'impianto tanto solido da consentirne il caricamento. La fissazione biologica precoce ideale di un impianto dovrebbe consistere nella formazione di spesse trabecole ossee ben mineralizzate, in diretto contatto con la maggior parte della superficie implantare e che allo stesso tempo riempiano anche buona parte del gap osso-impianto.

Nel presente studio il BIC_{NEW} si è rivelato più elevato negli impianti Zr-60, sia a 2 che a 4 settimane. La fissazione biologica di un impianto, tuttavia, dipende non solo dalla quantità di nuovo osso presente a diretto contatto con la superficie implantare ma anche dalla quantità e dalla qualità/morfologia del nuovo tessuto osseo cresciuto nel gap osso-impianto. La quantità di tessuto osseo neoformato presente nello spazio all'interfaccia è stata valutata in termini di BI, indipendentemente dall'estensione dell'area di contatto diretto osso-impianto: i valori più elevati di BI sia a 2 che a 4 settimane sono stati osservati negli impianti Zr-60.

La morfologia del tessuto osseo neoformato presente nella regione peri-implantare è stata valutata in termini del rapporto BS/BV [85]. Un valore alto di questo parametro indica un maggior perimetro in relazione ad una minor area e corrisponde ad una ben sviluppata rete tridimensionale di spesse trabecole ossee in grado di riempire lo spazio compreso tra impianto e osso ospite nel modo più veloce e più uniforme possibile [73, 85, 86]. La diminuzione nel tempo dei valori di BS/BV osservata in tutti i campioni confrontando i valori a 2 e a 4 settimane suggerisce che negli impianti analizzati si sia verificato un rimodellamento delle trabecole ossee neoformate presenti nella zona peri-implantare, con la formazione di osso lamellare costituito da trabecole ossee più spesse e con un minor numero di spazi midollari. Tale diminuzione di BS/BV passando dalle 2 alle 4 settimane è apparsa più accentuata negli impianti Zr-60 (46.1%), seguiti dai Zr-120 e infine dagli SS (rispettivamente 39.8% e 18.7%), indicando così negli impianti Zr-60 una più veloce maturazione del tessuto osseo.

In conclusione sia a 2 che a 4 settimane dall'intervento il miglior grado di osteogenesi peri-implantare valutato dal complesso dei risultati relativi ai tre parametri morfometrici di guarigione considerati (BIC, BI e BS/BV) è stato ottenuto negli impianti Zr-60.

A 2 settimane dall'inserzione i risultati relativi alla microdurimetria hanno rivelato negli impianti Zr-60 il più elevato grado di mineralizzazione del tessuto osseo neoformato. In tutti gli impianti analizzati è stato osservato un incremento temporale (passando dalle 2 alle 4 settimane) nel contenuto minerale del tessuto osseo neoformato presente nello spazio peri-implantare, senza differenze particolarmente significative tra un caso e l'altro. Da questi risultati si può ipotizzare che la morfologia di superficie dell'impianto abbia influenzato il grado di mineralizzazione del tessuto osseo peri-implantare neoformato prevalentemente nel periodo precoce di guarigione (2 settimane).

In conclusione la superficie che sembra aver favorito maggiormente l'osteogenesi peri-implantare, il turnover e la maturazione del tessuto osseo è quella degli impianti Zr-60.

BIBLIOGRAFIA

1. Parfitt A.M. (1994) Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cellular Biochem.* **55**(3):273-86.
2. Bowman B.M., and Miller S.C. (1986) The proliferation and differentiation of the bone-lining cell in estrogen-induced osteogenesis. *Bone* **7**(5):351-57.
3. Miller S.C., and Jee W.S. (1987) The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int.* **41**(1):1-5.
4. Park J.B. (1979) *Biomaterials: an introduction.* Plenum Press, New York.
5. Boyne P.J. (1984) Performance of bone grafts in reconstructive surgery. In: *Biocompatibility of bone natural tissues and their synthetic analogues.*, D.F. Williams ed., CRC Press, Boca Raton, Florida.
6. Williams D.F. (1982) *Biocompatibility of orthopaedic implants. Vol.I,* CRC Press, Boca Raton, Florida.
7. Carter D.R., and Spengler D.M. (1978) Mechanical properties and composition of cortical bone. *Clinical Orthop Relat Res.* (135):192-217.
8. Bedacht R. (1969) Tierexperimentelle und klinische untersuchungen uber die anwendung von heterologem kollagen als implantat in der knochenhohle von rohrenknochen. Habilitationsschrift, Universitat Munchen.
9. Springorum H.W. Adler C.P., Jger W., and Ober E. (1977) Tierexperimentelle untersuchungen der knochenregeneration am standardisierten tibiadefekt des kaninchens nach. Implantation von kollagenvlies im vergleich zur autologen und homologen spongiosaplastik. *Z Orthop.* **115**:686-93.

10. Springorum H.W. (1980) Tierexperimentelle untersuchungen der knochenregeneration nach kollagenimplantation in standardisierten knochendefekten an der ratte, am kaninchen, an wachsenden und ausgewachsenen hunden. Habilitationsschrift, Universitat Heidelberg.
11. Cutright D.E., Posey W.R., Bhaskar S.N., and Larson W.J. (1973) Collagen sponge--subcutaneous implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **35**(1):144-49.
12. Cobb C.M., Howell B.E., Gray R.C., and Weatherford T.W. (1976) Potential of elastin and collagen as initiators of in vivo calcification. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **41**(1):24-31.
13. Urist M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**(689):893-99.
14. Urist M.R., Silverman B.F., Buring K., Dubuc F.L., and Rosenberg J.M. (1967) The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res.* **53**:243-83.
15. Chalmers J., Gray D.H., and Rush J. (1975) Observations on the induction of bone in soft tissues. *J Bone Joint Surg.* **57**(1):36-45.
16. Guizzardi S., Di Silvestre M., Scandroglio R., Ruggeri A., and Savini R. (1992) Implants of heterologous demineralized bone matrix for induction of posterior spinal fusion in rats. *Spine* **17**(6):701-07.
17. Tuli S.M., and Singh A.D. (1978) The osteoinductive proprierty of decalcified bone matrix. An experimental study. *J Bone and Joint Surg Br.* **60**(1):116-23.
18. Oikarinen J., and Korhonen L.K. (1979) Repair of bone defects by bone inductive material. *Acta Orthop Scand.* **50**(1):21-26.
19. Dubuc F.L., and Urist M.R. (1967) The accessibility of the bone induction principle in surface-decalcified bone implants. *Clin Orthop Relat Res.* **55**:217-23.

20. Pearson G.E., Rosen S., and Deporter D.A. (1981) Preliminary observations on the usefulness of a decalcified, freeze-dried cancellous bone allograft material in periodontal surgery. *J Periodontol.* **52**(2):55-59.
21. Kaban L.B., Mulliken J.B., and Glowacki J. (1982) Treatment of jaw defects with demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac Surg.* **40**(10):623-26.
22. Charnley J. (1963) Tissue reactions to polytetrafluorethylene. *Lancet* **ii**:1379.
23. Charnley J. (1966) *Proc Inst Mech Eng.* **181**:104.
24. Charnley J. (1960) Surgical treatment of the arthritic hip. *J Bone and Joint Surg.* **42**:28.
25. Klawitter J.J., and Hulbert S.F. (1971) Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res.* **5**(6):161-229.
26. Charnley J. (1970) *Acrylic cement in orthopaedic surgery*, Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland.
27. Ungethum M., and Refior H.J. (1974) Ist aluminiumxidkeramik als gleitlagerwerks toff fur totaleu doprothesu geeiget? *Arch Orthop Unfallchir.* **79**(2):97-106.
28. Pietrabissa R. (1996) in: *Biomateriali per protesi e organi artificiali*. Pàtron ed., Bologna, Italy.
29. Zierold A.A. (1924) Reaction of bone to various metals. *Arch Surg.* **9**:365.
30. Japanese society for chemistry. (1995) *Biological activity of trace metals*, Gakkai-Shuppan-Center. Tokio, Japan.

31. Hanawa T. (1999) In vivo metallic biomaterials and surface modification. *Materials Science and Engineering:A* **267**(2):260-66(7).
32. McQueen D., Sundgren J.E., Ivarsson B. Lundström I., Ekenstam B.F., Svensson A., Albrektsson T., and Brånemark P.I. (1982) Auger electron spectroscopic studies of titanium implants. In: Clinical applications of biomaterials, Lee A.J.C., Albrektsson T. and Brånemark P.I. Eds., John Wiley & Sons Ltd., London, England.
33. Albrektsson T., and Jacobsson M. (1987) Bone–metal interface in osseointegration. *J Prosthet Dent.* **57**(5):597-607.
34. Macdonald D.E., Markovic B., Boskey A.L., and Somasundaran P. (1998) Physico-chemical properties of human plasma fibronectin binding to well characterized titanium dioxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **11**(3):131-39.
35. Anselme K., Linez P., Bigerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P., Hildebrand H.F., Iost A., and Leroy J.M. (2000) The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* **21**(15):1567-77.
36. Larsson C., Thomsen P., Aronsson B.O., Rodahl M., Lausmaa J., Kasemo B., and Ericson L.E. (1996) Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* **17**(6):605-16.
37. Cochran D.L., Schenk R.K., Lussi A., Higginbottom F.L., and Buser D. (1998) Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res.* **40**(1):1-11.

38. Bigerelle M., Anselme K., Noël B., Ruderman I., Hardouin P., and Iost A. (2002) Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials* **23**(7):1563-77.
39. Bagnò A., and Di Bello C. (2004) Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *Journal of materials science: materials in medicine*. **15**:935-49.
40. Taborelli M., Jobin P., Francois P., Vaudaux P., Tonetti M., Szmukler-Moncler S., Simpson J.P., and Descouts P. (1997) Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization. *Clin Oral Implants Res*. **8**(3):208-16.
41. Lincks J., Boyan B.D., Blanchard C.R., Lohmann C.H., Liu Y., Cochran D.L., Dean D.D., and Schwartz Z. (1998) Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* **19**(23):2219-32.
42. Mustafa K., Wennerberg A., Wroblewski J., Hultenby K., Silva Lopez B., and Arvidson K. (2001) Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Impl Res*. **12**(5):515-25.
43. Aparicio C., Gil F.J., Fonseca C., Barbosa M., and Planell J.A. (2003) Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials* **24**(2):263-73.
44. Wennerberg A., Albrektsson T., Andersson B., and Krol J.J. (1995) A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res*. **6**(1):24-30.
45. Wennerberg A., Albrektsson T., Ulrich H., and Krol J.J. (1992) An optical three-dimensional technique for topographical descriptions of surgical implants. *J Biomed Eng*. **14**(5):412-18.

46. Wennerberg A., Albrektsson T., Johansson C., and Andersson B. (1996) Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials* **17**(1):15-22.
47. Mustafa K., Silva Lopez B., Hultenby K., Wennerberg A., and Arvidson K. (1998) Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res.* **9**(3):195-207.
48. Wong M., Eulenberger J., Schenk R., and Hunziker E. (1995) Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res.* **29**(12):1567-75.
49. Francois P., Vaudaux P., Taborelli M., Tonetti M., Lew D.P., and Descouts P. (1997) Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (II) Adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin. *Clin Oral Implants Res.* **8**(3):217-25.
50. Buser D., Schenk R.K., Steinemann S., Fiorellini J.P., Fox C.H., and Stich H. (1991) Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* **25**(7):889-902.
51. Wennerberg A., Albrektsson T., and Andersson B. (1996) Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants.* **11**(1):38-45.
52. Healy K.E., Thomas C.H., Rezanian A., Kim J.E., McKeown P.J., Lom B., and Hockberger P.E. (1996) Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials* **17**(2):195-208.

53. Lee S.J. (2000) Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med J.* **41**(6):704-19.
54. Puleo D.A., and Nanci A. (1999) Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* **20**(23-24):2311-21.
55. Cooper L.F. (2000) A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent.* **84**(5):522-34.
56. Carlsson L., Rostlund T., Albrektsson B., and Albrektsson T. (1988) Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Impl.* **3**(1):21-24.
57. Thomas K.A., and Cook S.D. (1985) An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mat Res.* **19**(8):875-901.
58. Claes L., Hutzschenreuter P., and Pohler O. (1976) The dependence of the removal torque of a leg screw a screw surface and implantation time (author's transl). *Arch Orthop Unfallchir.* **85**(2):155-59.
59. Albrektsson T., and Johansson C. (1991) In: *The Bone-Biomaterial Interface.*, J.E. Davies ed., University of Toronto Press, Toronto, Canada.
60. Klokkevold P.R., Johnson P., Dadgostari S., Caputo A., Davies J.E., and Nishimura R.D. (2001) Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* **12**(4):350-57.
61. Brunette D.M. (1999) In vitro models of biological responses to implants. *Adv Dent Res.* **13**:35-37.
62. Bowers K.T., Keller J.C., Randolph B.A., Wick D.G., and Michaels C.M. (1992) Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* **7**(3):302-10.

63. Kononen M., Hormia M., Kivilahti J., Hautaniemi J., and Thesleff I. (1992) Effect of surface processing on the attachment, orientation and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res.* **26**(10):1325-41.
64. Martin J.Y., Schwartz Z., Hummert T.W., Schraub D.M., Simpson J., Lankford J. Jr., Dean D.D., Cochran D.L., and Boyan B.D. (1995) Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res.* **29**(3):389-401.
65. Degasne I., Basle M.F., Demais V., Hure G., Lesourd M., Grolleau B., and Mercier L. (1999) Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int.* **64**(6):499-507.
66. Robbins Pathologic basis of disease 6th ed. (1999) by Cotran R.S., Kumar V. and Collins T., WB Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania.
67. Siggelkow H., Rebenstorff K., Kurre W., Niedhart C., Engel I., Schulz H., Atkinson M.J., and Hufner M. (1999) Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* **75**(1):22-35.
68. Schiller P.C., D'Ippolito G., Balkan W., Roos B.A., and Howard G.A. (2001) Gap junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* **28**(4):362-69.
69. Guizzardi S., Galli C., Martini D., Belletti S., Tinti A., Raspanti M., Taddei P., Ruggeri A., and Scandroglio R. (2004) Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodontol.* **75**(2):273-82.
70. Abrahamsson I., Berghlundh T., Linder E., Lang N.P., and Lindhe J. (2004) Early bone formation adjacent to endosseous implants surface. An experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res.* **15**(4):381-92.

71. Davies J.E. (1998) Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* **11**(5):391-401.
72. Ferretti M., Palombo C., Contri M., and Marotti G. (2002) Static and dynamic osteogenesis: two different types of bone formation. *Anat Embryol.* **206**(1-2):21-29.
73. Franchi M., Fini M., Martini D., Orsini E., Leonardi L., Ruggeri A., Giavaresi G., and Ottani V. (2005) Biological fixation of endosseous implants. *Micron* **36**(7-8):665-71.
74. Berglundh T., Abrahmsson I., Lang N.P., and Lindhe J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res.* **14**(3):251-62.
75. Chappard D., Aguado E., Hure G., Grizon F., and Basle M.F. (1999) The early remodeling phases around titanium implants: a histomorphometric assessment of bone quality in a 3- and 6-month study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants.* **14**(2):189-96.
76. Buser D., Nydegger T., Oxland T., Cochran D.L., Schenk R.K., Hirt H.P., Snetivy D., and Nolte L.P. (1999) Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* **45**(2):75-83.
77. Meyer U., Joos U., Mythili J., Stamm T., Hohoff A., Fillies T., Stratmann U., and Wiesmann H.P. (2004) Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomaterials* **25**(10):1959-67.
78. Davies J.E., Lowenberg B., and Shiga A. (1990) The bone-titanium interface in vitro. *J Biomed Mater Res.* **24**(10):1289-306.

79. Melcher A.H., Cheong T., Cox J., Nemeth E., and Shiga A. (1986) Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone: a light and electron microscope study. *J Periodontal Res.* **21**(6):592-612.
80. Sautier J.M., Nefussi J.R., and Forest N. (1992) Mineralization and bone formation on microcarrier beads with isolated rat calvaria cell population. *Calcif Tissue Int.* **50**(6):527-32.
81. Davies J.E. (1996) In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec.* **245**(2):426-45.
82. Albrektsson T., and Wennerberg A. (2004) Oral implant surfaces: Part 1-review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* **17**(5):536-43.
83. Vercaigne S., Wolke J.G., Naert I., and Jansen J.A. (1998) Histomorphometrical and mechanical evaluation of titanium plasma-spray-coated implants placed in the cortical bone of goats. *J Biomed Mater Res.* **41**(1):41-48.
84. Hallgren C., Reimers H., Gold J., and Wennerberg A. (2003) The importance of surface texture for bone integration of screw shaped implants: an in vivo study of implants patterned by photolithography. *J Biomed Mater Res.* **57**(4):485-96.
85. Parfitt A.M. (1987) Bone remodeling and bone loss: understanding the pathophysiology of osteoporosis. *Clin Obstet Gynecol.* **30**(4):789-811.
86. Franchi M., Fini M., Giavaresi G., and Ottani V. (2005) Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron* **36**(7-8):630-44.

ICONOGRAFIA

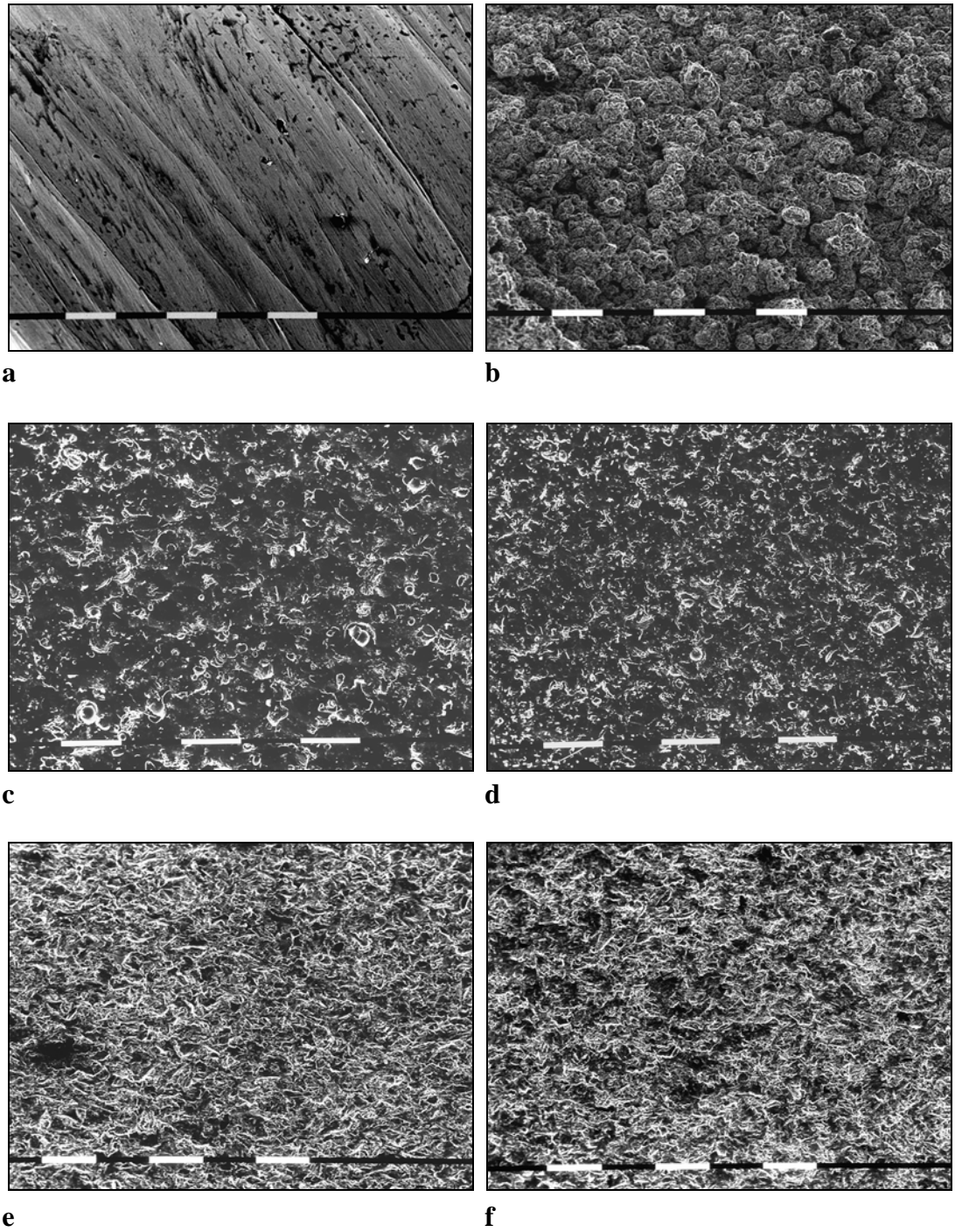
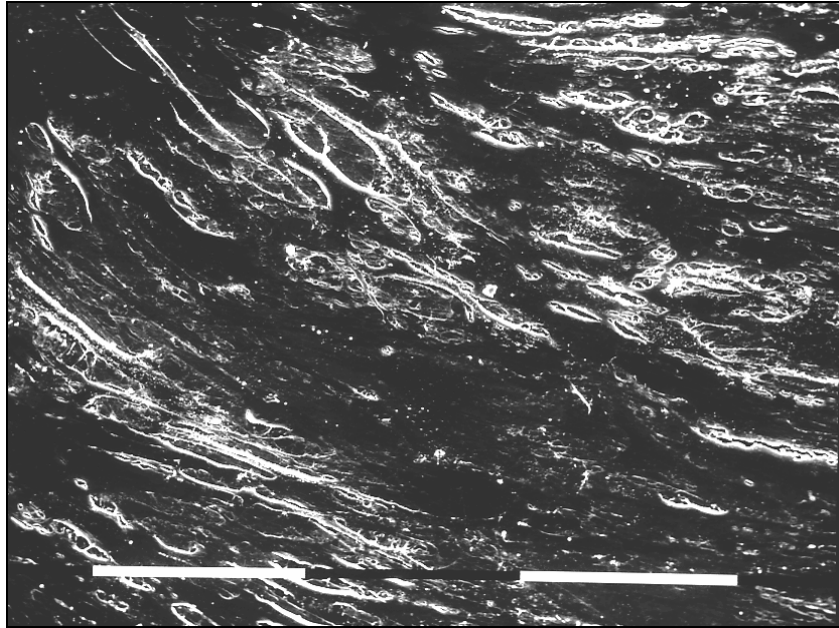
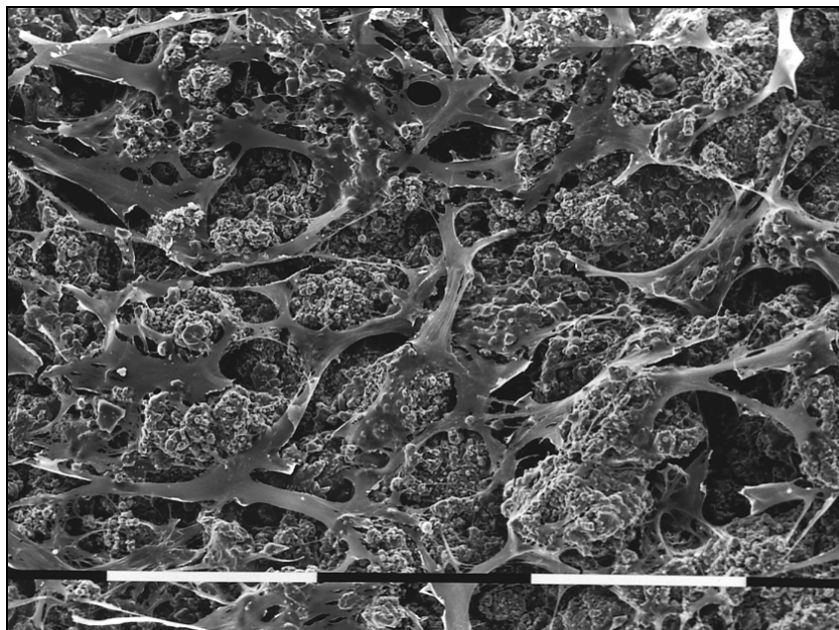


Fig. 1 Morfologia di superficie delle placchette utilizzate negli studi *in vitro* (SEM; Bar=100 µm).

a) SS; **b)** TPS; **c)** Zr-60; **d)** Zr-120; **e)** Al-100; **f)** Al-150.

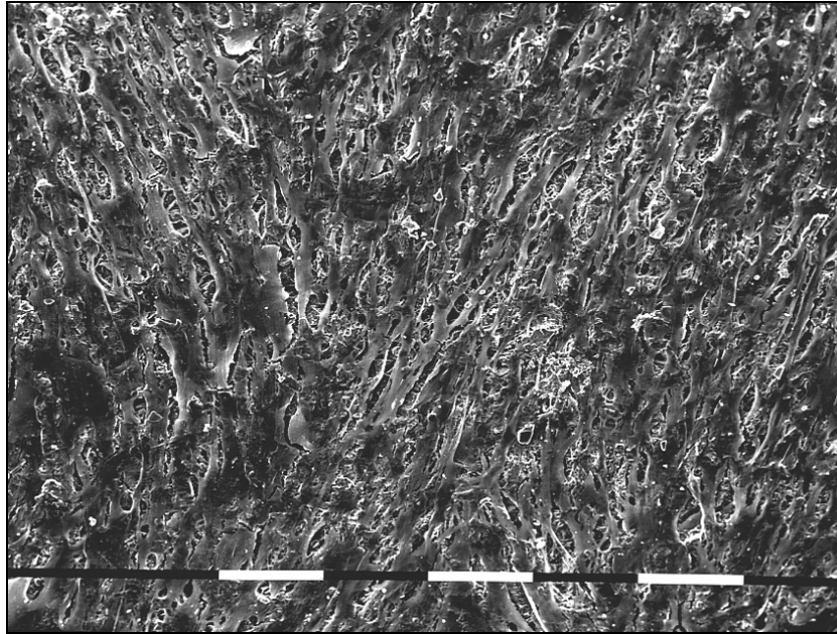


a

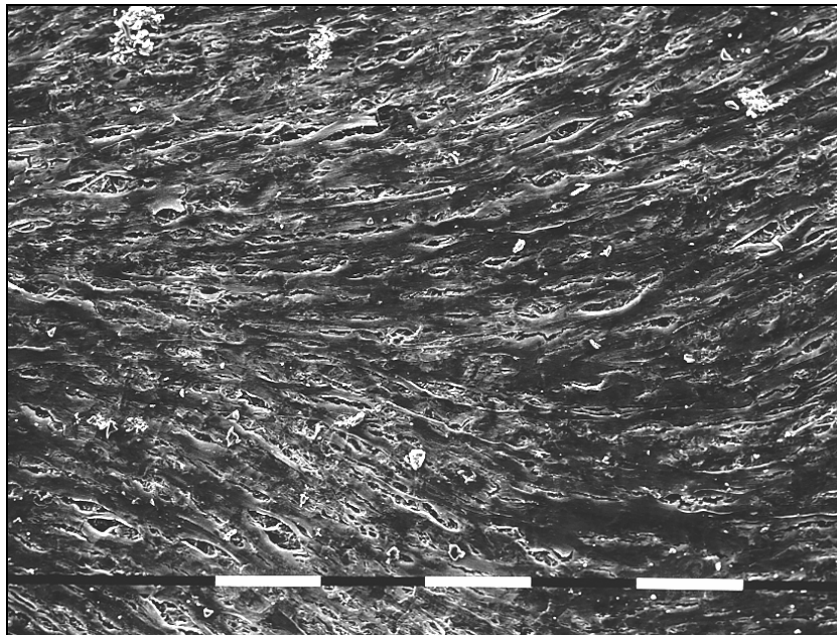


b

Fig. 2 Osteoblasti su placchette, a 12 giorni di coltura (SEM; Bar=100 μ m).
a) SS; **b)** TPS.

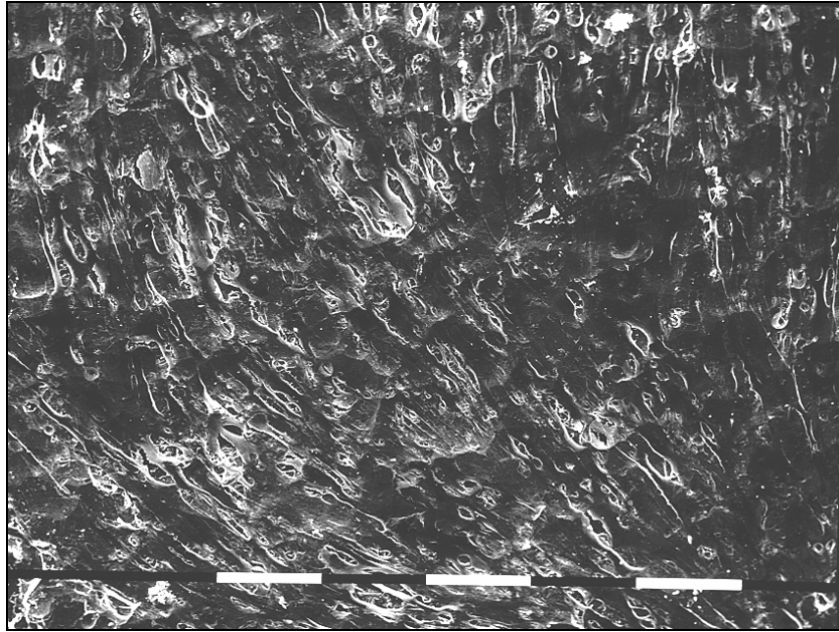


a

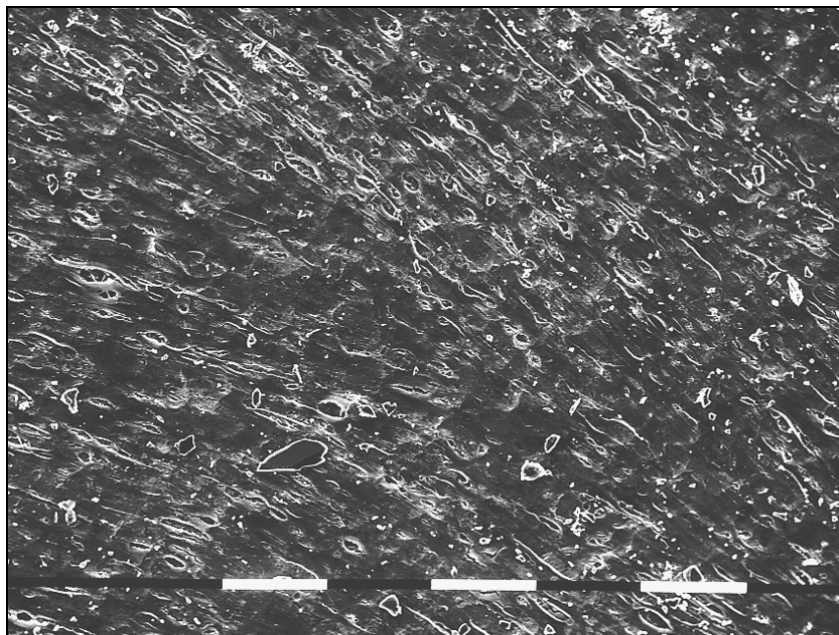


b

Fig. 3 Osteoblasti su placchette, a 12 giorni di coltura (SEM; Bar=100 μ m).
a) Zr-60; **b)** Zr-120.

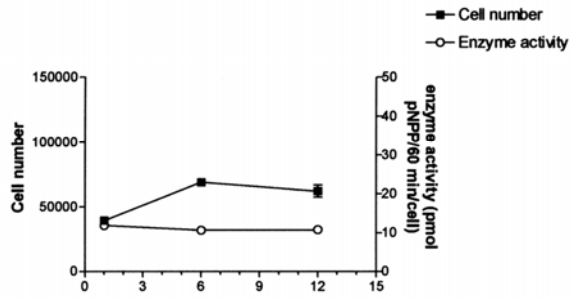


a

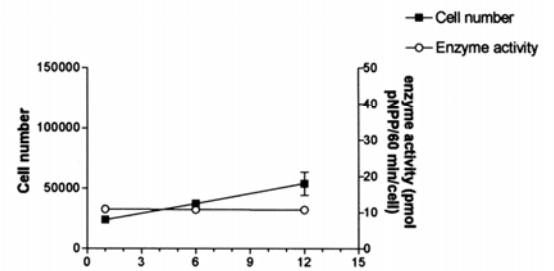


b

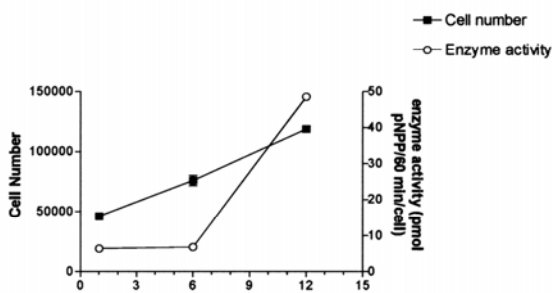
Fig. 4 Osteoblasti su placchette, a 12 giorni di coltura (SEM; Bar=100 μ m).
a) Al-100; **b)** Al-150.



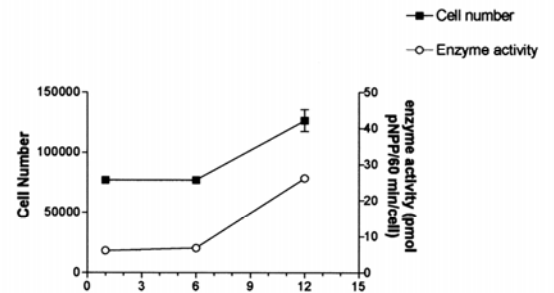
a)



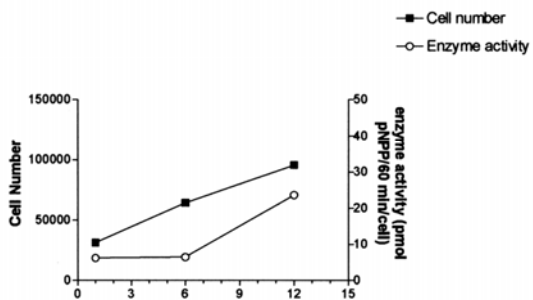
b)



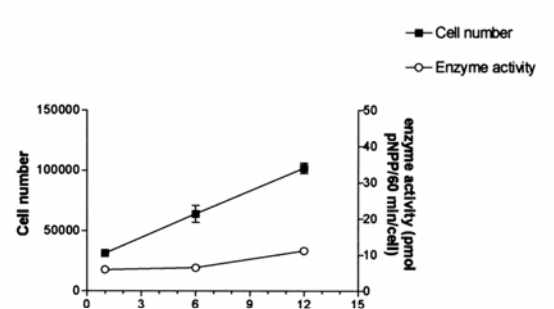
c)



d)



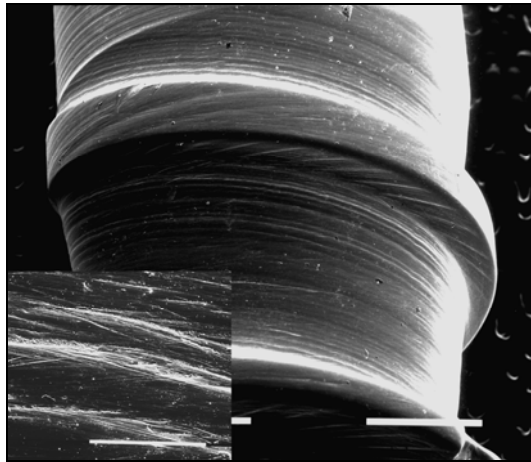
e)



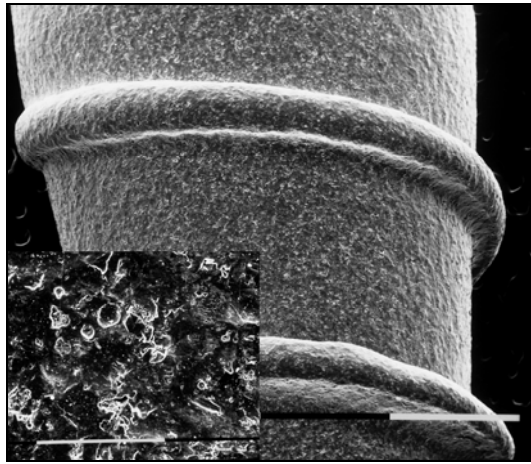
f)

Fig. 5 Curve di crescita osteoblastica e andamento dell'attività della fosfatasi alcalina sulle diverse superfici.

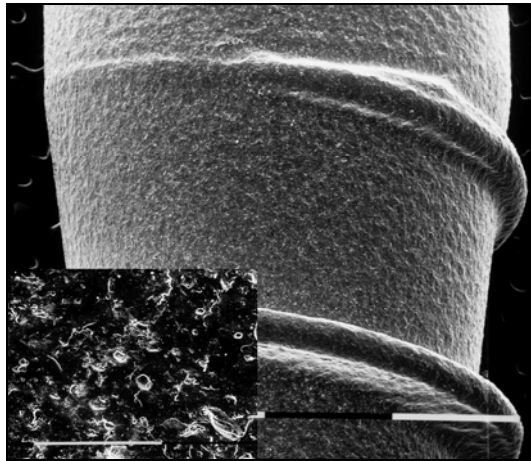
a) SS; b) TPS; c) Zr-60; d) Zr-120; e) Al-100; f) Al-150.



a



b

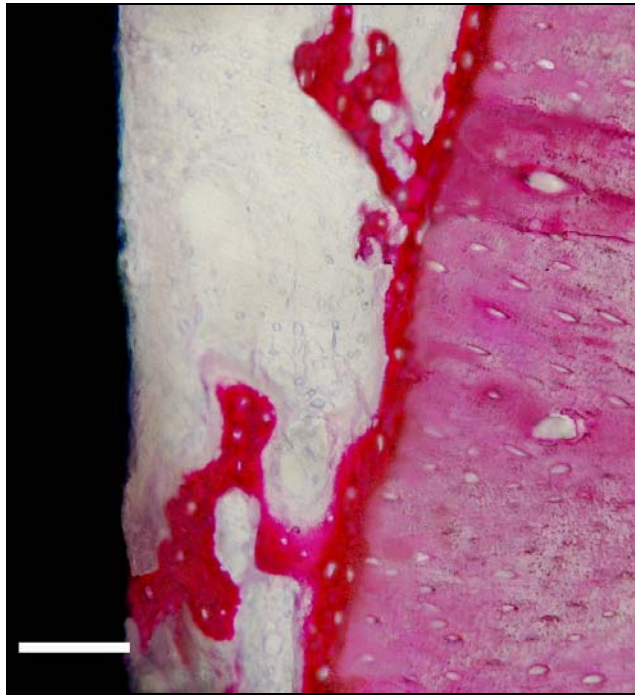


c

Fig. 6 Morfologia degli impianti utilizzati negli studi *in vivo* (SEM; Bar=1000 μm). Nell'inserto un dettaglio della superficie implantare (SEM; Bar=100 μm).
a) SS; **b)** Zr-60; **c)** Zr-120.



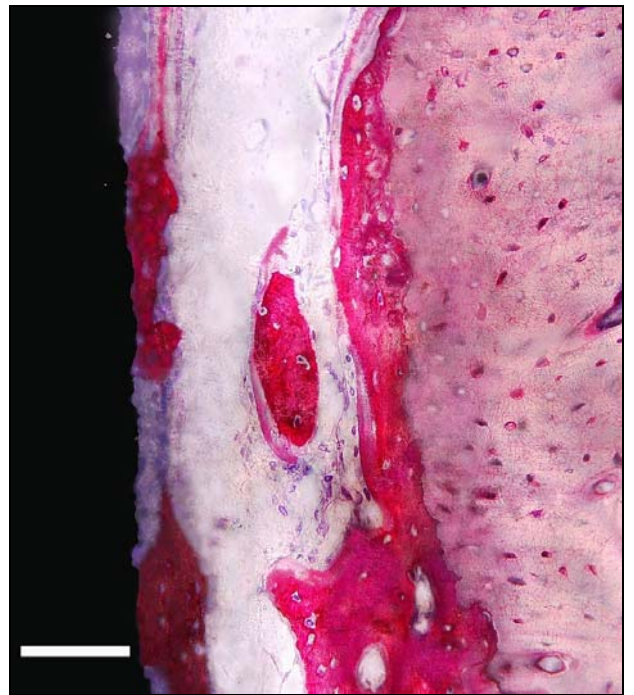
Fig. 7 Impianto e tessuto peri-implantare in sezione longitudinale (MO).



a

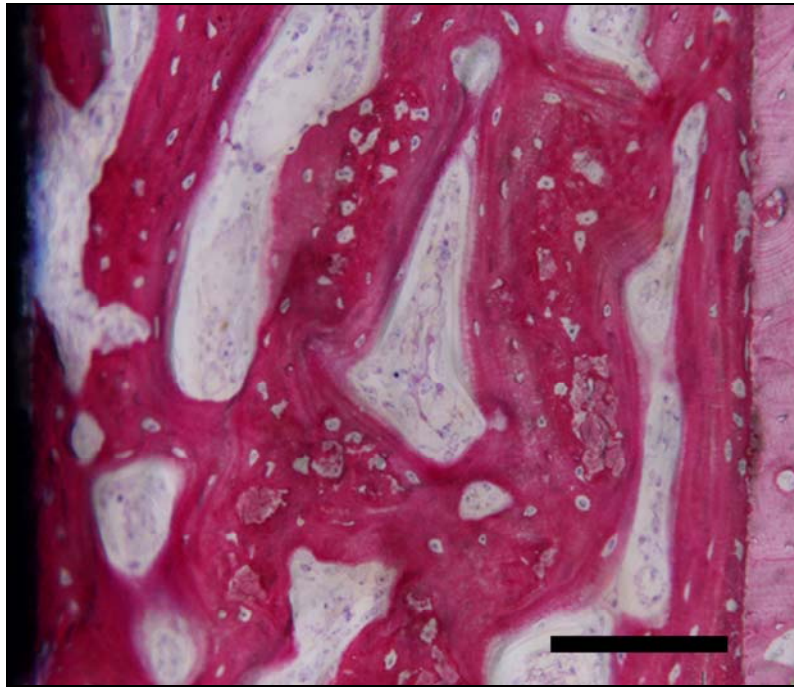


b

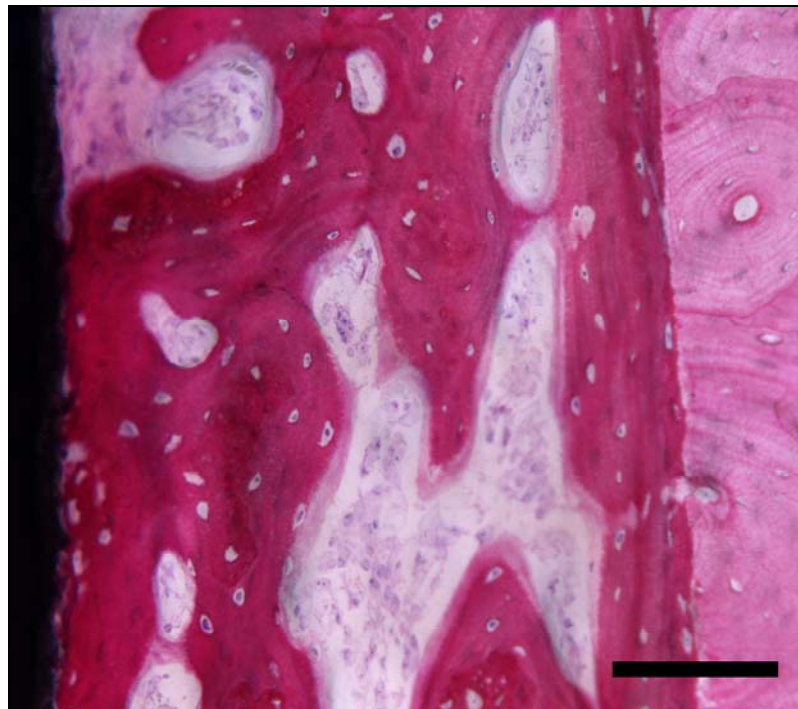


c

Fig. 8 Gap osso-impianto con trabecole di tessuto osseo neoformato, a 2 settimane dall'inserzione implantare (MO; Bar= 100 μ m).
a) SS; b) Zr-60; c) Zr-120.



a



b

Fig. 9 Gap osso-impianto con un fitto network di trabecole ossee di tipo lamellare, a 4 settimane dall'inserzione implantare (MO; Bar= 100 μ m).
a) Zr-60; b) Zr-120.

Table 1 Histomorphometric parameters for all tested surfaces at different experimental times. Mean \pm SD, n = 4.

	2 weeks			4 weeks		
	T	SLA-60	SLA-120	T	SLA-60	SLA-120
BIC _{NEW} (%)	18.0 \pm 1.8	19.8 \pm 1.2	17.5 \pm 1.0	23.4 \pm 1.8 ^{o,a}	32.2 \pm 1.3 ^c	19.2 \pm 1.8 [#]
BIC _{OLD} (%)	16.4 \pm 4.5	14.7 \pm 3.9	22.4 \pm 7.0	14.6 \pm 5.1	10.8 \pm 1.1 [†]	20.0 \pm 6.5
BIC _{TOT} (%)	34.4 \pm 8.2	34.5 \pm 5.5	39.9 \pm 7.7	38.0 \pm 7.9	43.0 \pm 6.9	39.2 \pm 8.3
BI (%)	21.7 \pm 2.4	28.9 \pm 2.7*	22.5 \pm 2.4	31.8 \pm 2.8	43.0 \pm 2.4 [^]	37.9 \pm 2.7
BS/BV (%)	13.9 \pm 1.5 [§]	23.2 \pm 2.4	23.1 \pm 2.0	11.3 \pm 1.3 ^{oo,b}	12.5 \pm 2.2 ^d	13.9 \pm 1.1 ^e

BIC: Bone-to-implant contact; BI: Bone Ingrowth; BS/BV: Bone Surface

Scheffé *post hoc* multiple comparison test between surface treatments within each experimental time:

2 weeks: *SLA-60 *versus* T and SLA-120 ($p < 0.005$); §, T *versus* SLA-60 and SLA-120 ($p < 0.05$).

4 weeks: #, SLA-120 *versus* SLA-60 ($p < 0.0005$); °, T *versus* SLA-60 and SLA-120 ($p < 0.005$); †, SLA-60 *versus* SLA-120 ($p < 0.05$); ^, SLA-60 *versus* T ($p < 0.05$) and SLA-120 ($p < 0.001$); oo, T *versus* SLA-60 ($p < 0.05$) and SLA-120 ($p < 0.01$).

Student *t*-test between experimental times within each surface treatments:

T: ^a, ($p < 0.05$); ^b, ($p < 0.05$);

SLA-60: ^c, ($p < 0.0005$); ^d, ($p < 0.0005$);

SLA-120: ^e, ($p < 0.0005$);

Tabella 1 Risultati delle analisi istomorfometriche.

Table 2. Bone microhardness results for type of implants at 2 and 4 weeks. Mean \pm SD, n = 4

Parameter	2 weeks			4 weeks		
	T	SLA-60	SLA-120	T	SLA-60	SLA-120
HV ₂₀₀ (HV)	34.9 \pm 0.8	39.2 \pm 0.6	35.2 \pm 0.3	46.4 \pm 1.8 ^a	46.3 \pm 1.8	44.3 \pm 1.3 ^d
BMI (%)	47.8 \pm 1.2	53.5 \pm 0.9 [*]	48.0 \pm 1.1	60.4 \pm 1.5 [°] , ^b	63.3 \pm 1.3 ^c	63.1 \pm 1.2 ^e

HV₂₀₀: Bone microhardness within 200 μ m from the interface; BMI : Bone Maturation Index.

Scheffé *post hoc* multiple comparison test between surface treatments within each experimental time:

2 weeks: ^{*}, SLA-60 *versus* T and SLA-120 ($P < 0.005$);

4 weeks: [°], T *versus* SLA-60 and SLA-120 ($P < 0.05$);

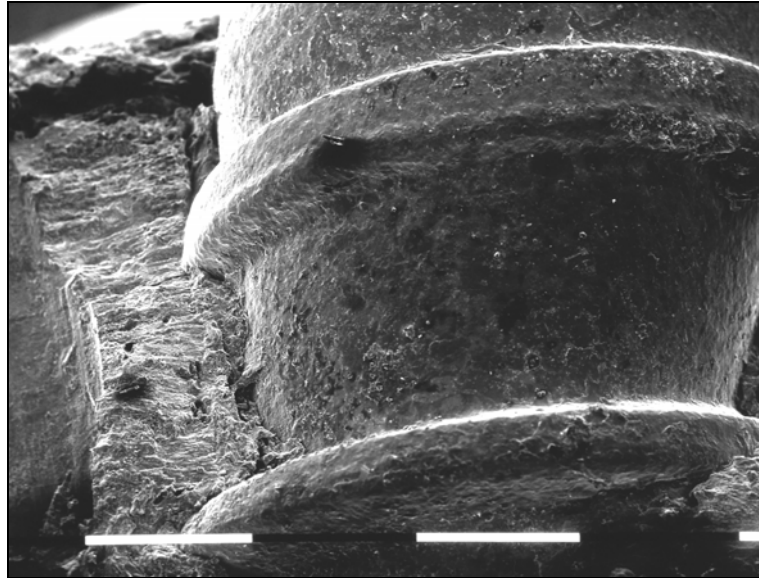
Student *t*-test between experimental times within each surface treatments:

T: ^a, ($P < 0.001$); ^b, ($P < 0.0005$);

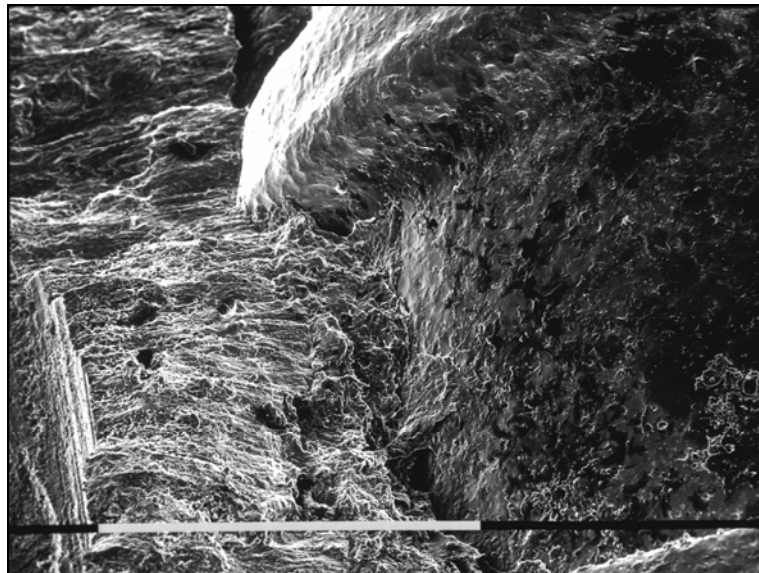
SLA-60: ^c, ($P < 0.0005$);

SLA-120: ^d, ($P < 0.05$); ^e, ($P < 0.0005$).

Tabella 2 Risultati del test microdurimetrico di Vickers.



a

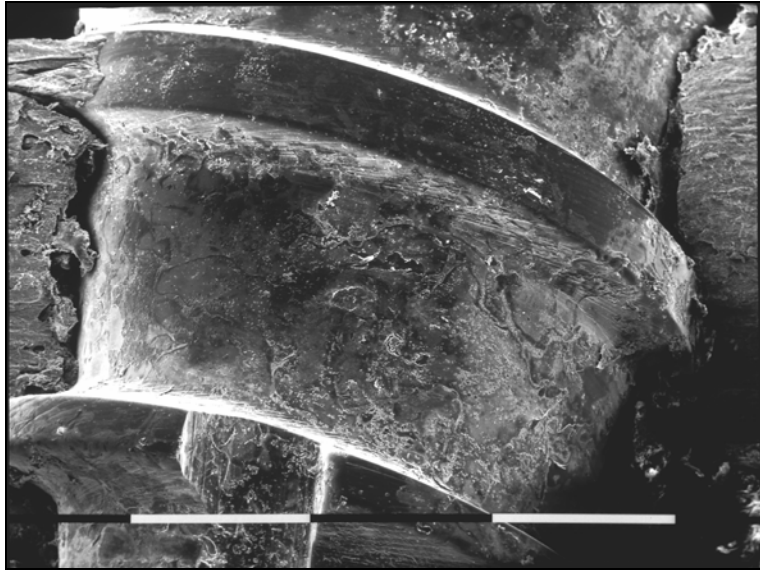


b

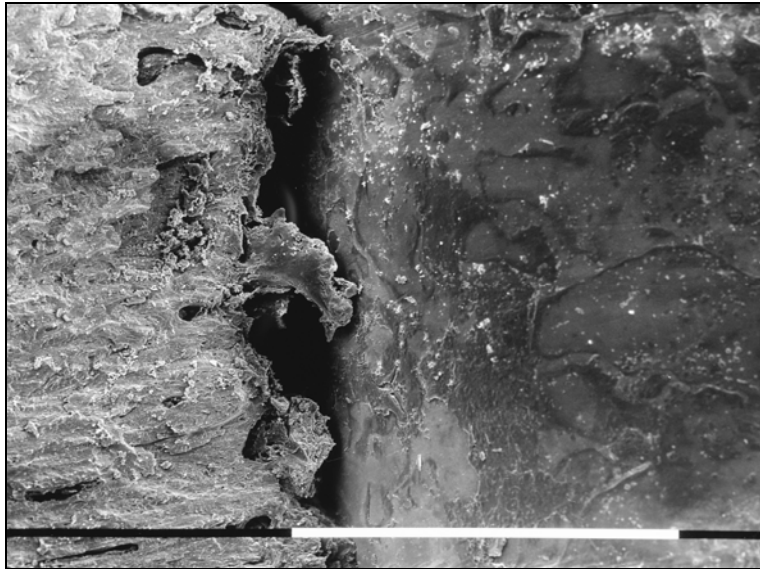
Fig. 10

a) Impianto Zr-60 con tessuto peri-implantare, ad 1 mese dall'inserzione (SEM; Bar=1000 μm).

b) Dettaglio della **Fig. 10a**, in cui sono ben evidenti le numerose trabecole di tessuto osseo saldamente ancorate alla superficie implantare (SEM; Bar=100 μm).



a



b

Fig. 11

a) Impianto SS con tessuto peri-implantare, ad 1 mese dall'inserzione (SEM; Bar=1000 μm).

b) Dettaglio della **Fig. 11a**, in cui è evidente la discontinuità tra superficie implantare e tessuto osseo a livello del gap (SEM; Bar=100 μm).

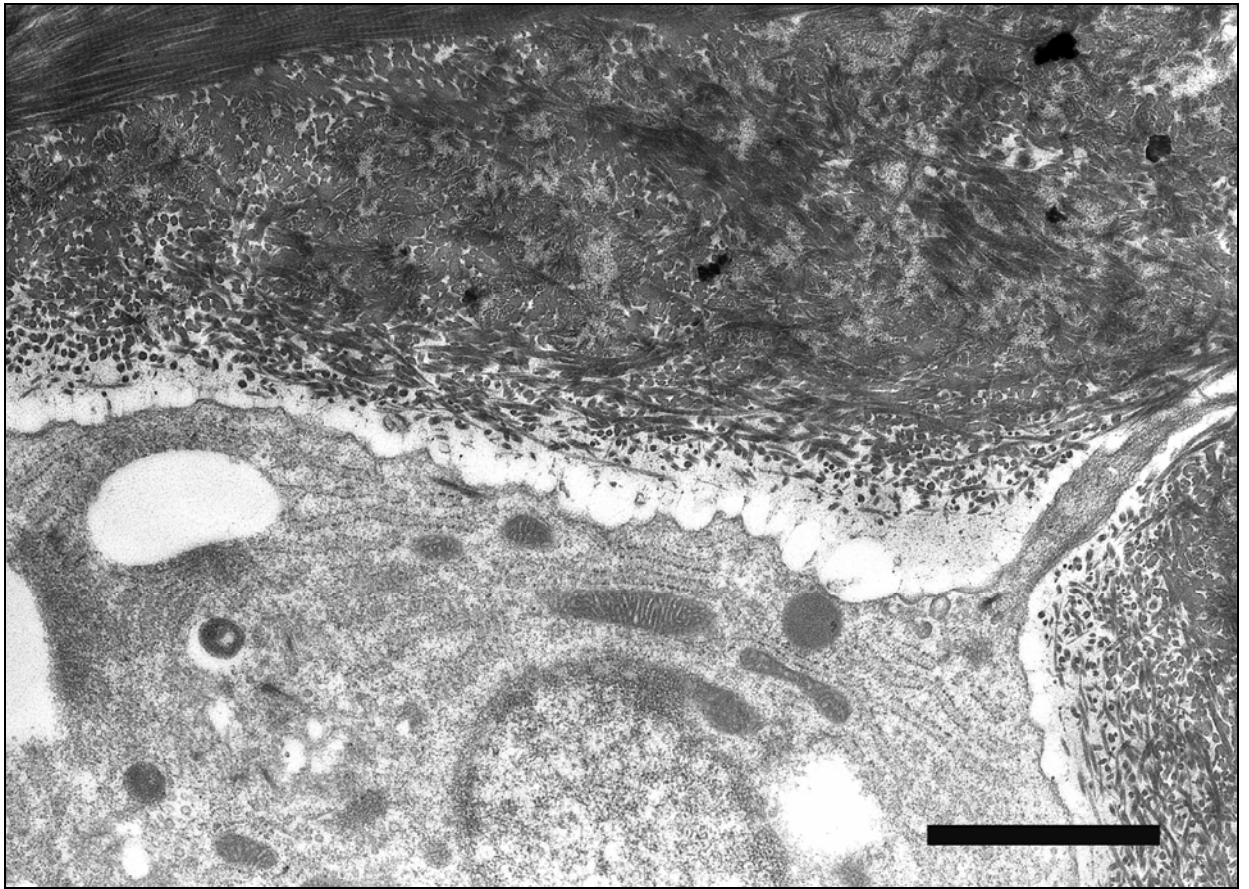


Fig. 12 Dettaglio di un osteoblasto in intensa attività secretiva immerso nel tessuto osseo peri-implantare, a 2 settimane dall'inserzione di un impianto Zr-120 (TEM; Bar=2 μ m).

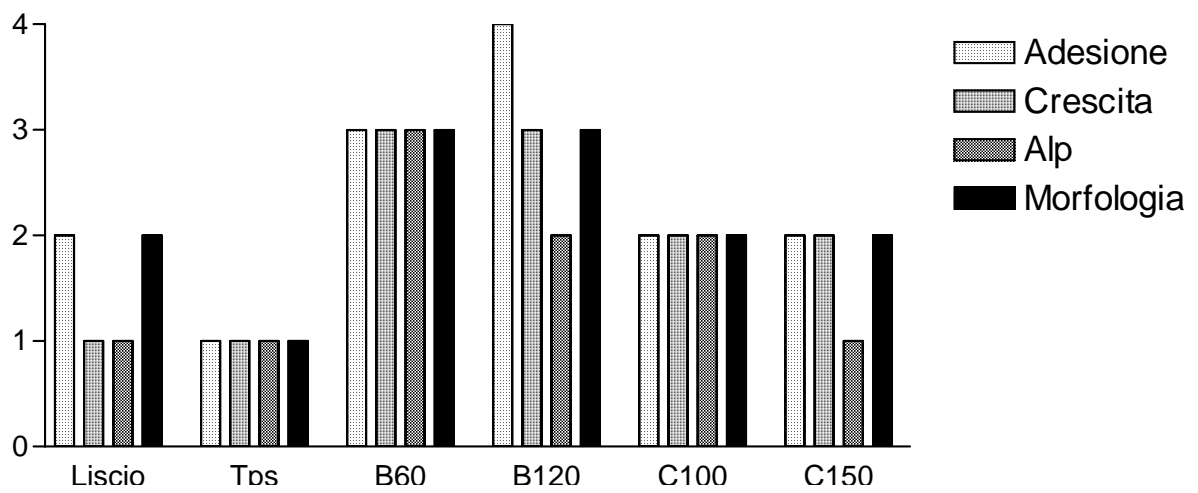


Tabella 3 Rappresentazione schematica della performance delle placchette utilizzate negli studi *in vitro*.