



*Università degli Studi di Milano-Bicocca*

*Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Corso di Laurea Magistrale in Odontoiatria e Protesi Dentaria  
Presidente: Prof. Marco Baldoni*

---

**Tesi di Dottorato in Parodontologia Sperimentale**

**STUDIO IN VITRO DEL PROCESSO DI OSTEOINTEGRAZIONE  
MEDIANTE L'UTILIZZO DI CELLULE STAMINALI  
MESENCHIMALI ADULTE**

Alessandro Leonida  
Matricola 725093

**TUTOR:** Prof. Marco Giovanni Baldoni  
**COTUTORE:** Dott. Fabrizio Carini

## INTRODUZIONE

L'osteointegrazione, sia in osso nativo sia in osso innestato, è un processo paragonabile alla guarigione dopo frattura ossea che, a sua volta, possiede dei pattern di guarigione in comune con ogni processo rigenerativo dell'organismo [1]. I processi di guarigione e di riparazione, infatti, coinvolgono una sequenza di eventi vascolari e cellulari estremamente precisi e codificati. Questi meccanismi iniziano con la formazione del coagulo ematico da parte delle piastrine e la sintesi di un network fibrinico che agisce da scaffold tridimensionale. Contemporaneamente, le piastrine rilasciano fattori di crescita che attirano i leucociti e le cellule staminali, allo scopo di pulire la ferita e rigenerare il volume perso a causa del danno. Le cellule staminali, infatti, possiedono la possibilità di differenziare verso diverse linee cellulari, a seconda del tipo di tessuto coinvolto dalla lesione. [2-3]

Quando una fixture in titanio viene posizionata all'interno dell'osso alveolare, la stabilità dell'impianto è conferita esclusivamente dalla corticale ossea ed è definita stabilità primaria. A livello microscopico l'osso attorno alle spire degenera, la stabilità primaria decresce e le piastrine iniziano a creare lo scaffold in fibrina a contatto con la superficie metallica. Le cellule staminali giungono dall'osso periferico sano e, sfruttando questo network, raggiungono l'impianto, proliferano e differenziano verso la linea osteoblastica, qualora l'osteointegrazione proceda senza inconvenienti. Questi nuovi osteoblasti iniziano a deporre matrice ossea direttamente tra le spire, determinando la crescita della stabilità secondaria parallelamente alla riduzione della stabilità primaria. Tra la seconda e la quarta settimana dopo il posizionamento dell'impianto la stabilità primaria è ormai molto ridotta, mentre la stabilità secondaria non ha raggiunto ancora un sufficiente grado di maturazione: per questo motivo la maggior parte dei fallimenti implantari sono registrati nella suddetta finestra di tempo (flessione della stabilità) (fig. 1). [4]

La maggior parte degli studi contemporanei sono rivolti alla ricerca di nuove superfici implantari in grado di aumentare la velocità di proliferazione e differenziazione delle cellule staminali in osteoblasti: questo è in grado di accelerare il processo di crescita della stabilità secondaria, appiattendone la curva che rappresenta la flessione della stabilità attraverso lo spostamento della curva della stabilità secondaria verso l'asse delle ordinate (fig. 2).

## **INGEGNERIA TISSUTALE**

Durante il 1st Tissue Engineering (TE) Symposium, tenutosi nel 1988 in California, si assiste al primo tentativo ufficiale di definire l'ingegneria tissutale come l'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale' [5]. La necessità era quella di inquadrare una nuova tendenza della ricerca medica e coordinare i molti progressi già raggiunti nelle più distanti aree scientifiche, per trasferirne i frutti alla pratica clinica. Questa grande operazione che vide scienze come l'ingegneria, la chimica, la fisica, la biologia, le biotecnologie e la medicina confrontarsi ed impegnarsi in approccio multidisciplinare all'ingegneria dei tessuti, forse è il punto che meglio segna il passaggio ad una nuova era di ricerca.

La strategia nuova dell'ingegneria tissutale consisteva nell'avvalersi di cellule viventi (e/o loro prodotti) e di supporti innovativi, per sviluppare sostituti tissutali bioattivi in alternativa agli impianti inerti.

In un primo momento furono condotti studi per creare sistemi che riproducessero fedelmente i tessuti e gli organi naturali nella forma, nelle proprietà e nella funzione.

In poco tempo fu evidente che la complessità dei tessuti biologici in termini di composizione macromolecolare, organizzazione ultrastrutturale e interazioni tra cellule e ambiente, rendevano difficile il passaggio dei costrutti ingegnerizzati dall'ambito sperimentale a quello clinico.

Durante quel periodo è stata approfondita la conoscenza sulle potenzialità dell'utilizzo di cellule, fattori e *scaffolds* biocompatibili per la ricostruzione tissutale, ma non è stata posta alcuna attenzione al mimare la 'non omogeneità' dei tessuti nativi, cioè quella combinazione di elementi

cellulari, molecole tessuto specifiche, micro- e macro struttura che determinano le peculiari proprietà chimiche, fisiche e meccaniche del tessuto necessarie allo svolgimento della propria funzione.

Sul finire della prima decade di studi è stato chiaro che l'ingegneria tissutale non aveva ancora risposto alle grandi aspettative di fornire nuove modalità terapeutiche per i trattamenti clinici con tessuti ingegnerizzati o sostituzioni d'organo con cellule viventi.

Quindi si doveva andare oltre. Così nel 1998 la comunità scientifica decise di adottare un nuovo paradigma per enfatizzare l'importanza della biomeccanica nel design e nello sviluppo di impianti *cell-* e *matrix-based* per la riparazione dei tessuti molli e di quelli duri. In questo senso si può parlare di un'evoluzione della TE, in ingegneria tissutale funzionale (FTE), il cui obiettivo era focalizzarsi sull'importanza di ristabilire la funzione del tessuto o organo, identificando le esigenze meccaniche e strutturali critiche *in situ*, del tessuto da ripristinare.

Questo è stato il secondo grande passo alla luce dell'esperienza collettiva della TE della prima decade. Questo tipo di approccio ha avuto riscontro in particolare per quei tessuti che sono soggetti a sopportare ingenti carichi o ripetute sollecitazioni, come quello muscolo-scheletrico o cardiaco [6]. Gli studi nell'ambito dell'ingegneria tissutale, settore tuttora in grande espansione, hanno aggiunto agli sforzi per lo sviluppo di una sempre maggiore varietà di costrutti ingegnerizzati, la considerazione delle qualità funzionali e meccaniche che questi devono possedere per adempiere le funzioni e soddisfare gli intenti perseguiti: primo fra tutti superare i limiti dei trattamenti convenzionali di trapianto d'organo e impianto protesico.

## **IL TESSUTO OSSEO**

Il tessuto osseo fa parte, insieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati per la funzione di protezione e sostegno. Esso origina dal mesenchima come gli altri connettivi, ed è costituito da cellule, fibre e una matrice complessa, in cui si distinguono una parte organica ed una inorganica.

La peculiarità del tessuto osseo è quella di essere calcificato. Nella porzione inorganica della sostanza intercellulare vengono depositati cristalli minerali costituiti prevalentemente da sali di calcio e fosfato, sottoforma di calcio-idrossiapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , e in quantità minore da carbonato di calcio e altri minerali.

All'interno della matrice extracellulare sono disperse fibre organiche altamente ordinate, costituite per il 90% da collagene (di questo, il 97% è di tipo I e il 3% di tipo V) e per la restante parte da numerose proteine non collageniche (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina, trombospondina, sialoproteine, proteoglicani, biglicani, albumine ed immunoglobuline) e acqua [7].

La presenza di minerale conferisce al tessuto spiccate proprietà meccaniche come durezza e resistenza al carico; la composizione e la distribuzione delle componenti proteiche della matrice, elasticità e resistenza alle fratture. In particolare il collagene I vanta una peculiare struttura terziaria caratterizzata dall'avvolgimento elicoidale di tre catene polipeptidiche uguali in cui sono ripetute sequenze di amminoacidi in genere poco frequenti nelle proteine (prolina, glicina, idrossiprolina e idrossilisina); è proprio tale struttura a conferire le proprietà elastiche alla molecola e quindi all'osso [8].

Il tessuto osseo, inoltre, rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo: la deposizione di calcio nell'osso e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono alla regolazione dei livelli plasmatici dello ione.

Dal punto di vista macroscopico si distinguono due tipologie di osso: spugnoso (o trabecolare) e compatto. L'osso spugnoso è adatto a resistere a sollecitazioni di tipo compressivo e per questo si trova principalmente nelle ossa brevi, in quelle piatte e nelle epifisi delle ossa lunghe. La struttura spongiforme è caratterizzata dalla presenza di trabecole variamente orientate ed intersecate in una rete tridimensionale, nelle cui cavità è contenuto il midollo osseo. L'osso compatto deve il nome alla rigidità che lo caratterizza e lo rende resistente alla compressione, tensione e torsione; si trova nelle diafisi delle ossa lunghe e riveste il tessuto spugnoso delle ossa brevi e piatte. La sua unità principale, l'osteone, è costituita da lamelle concentriche formatesi dall'ordinata deposizione di fibre collagene intorno al canale di Havers, che contiene i vasi sanguigni. Intorno vi sono canali più piccoli detti laterali: nel loro insieme i canali laterali e quelli haversiani formano un sistema continuo di cavità che permette gli scambi tra sangue e cellule ossee.

Il tessuto osseo compatto e spugnoso sono costituiti dagli stessi elementi cellulari e dalle stesse proteine della matrice, pur svolgendo funzioni strutturali e metaboliche diverse. Circa l'80%-90% del tessuto compatto è calcificato, mentre quello spugnoso lo è per il 5-25%. Questo fa sì che il primo abbia prevalentemente una funzione meccanica ed il secondo metabolica.

Dal punto di vista istologico l'osso è rivestito esternamente da una lamina connettivale chiamata periostio, assente in corrispondenza delle cartilagini articolari e delle zone di inserzione di tendini e legamenti.

Nonostante l'apparente staticità e l'effettiva rigidità, il tessuto osseo è estremamente dinamico: durante le fasi della vita è costantemente soggetto a cicli di riassorbimento e deposizione, mirati a

soddisfare le esigenze metaboliche e funzionali dell'accrescimento o ad adeguare la struttura dello scheletro alle sollecitazioni meccaniche cui è sottoposto.

L'insieme dei processi di rimozione e formazione di nuovo tessuto è denominato rimodellamento osseo. Ciò si verifica grazie ad una stretta correlazione funzionale tra le cellule ossee e numerosi i fattori che ne coordinano l'attività, per la regolazione e il mantenimento dell'omeostasi scheletrica.

### ***Cellule del tessuto osseo***

La componente cellulare del tessuto osseo è costituita da: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti e osteoclasti. Le cellule ossee regolano sinergicamente il continuo rimodellamento, la riparazione e la rigenerazione tissutale. Essenziale è anche il contributo delle cellule endoteliali nel provvedere, con l'angiogenesi, all'apporto di nutrienti e ossigeno necessari al metabolismo e all'allontanamento dei prodotti del catabolismo cellulare.

Le cellule osteoprogenitrici (preosteoblasti), gli osteoblasti e gli osteociti sono fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare, a sua volta derivato dal differenziamento in senso osteogenico della cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi. Gli osteoclasti, invece, derivano da precursori (preosteoclasti) differenziati dalle cellule staminali del midollo osseo ematopoietico e immigrati nel tessuto osseo dal sangue.

I **preosteoblasti** hanno forma piatta ed allungata, con citoplasma scarso e basofilo ed un nucleo eucromatico con un grande nucleolo. Tali cellule si collocano sulle superfici libere delle ossa, al livello dello strato più interno del periostio apposto all'osso, lo strato osteogenico di Ollier, riccamente vascolarizzato. Sono altresì localizzate al livello del tessuto connettivo lasso che riveste le cavità interne dell'osso, chiamato endostio, in vicinanza dei capillari sanguigni.

Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo, ma che si mantiene anche durante la vita adulta. Il differenziamento delle cellule preosteoblastiche in osteoblasti maturi avviene grazie allo stimolo di numerosi fattori, principalmente il paratormone (PTH), l'ormone della crescita (GH) e il transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ).

Gli **osteoblasti** sono le cellule responsabili della sintesi della matrice extracellulare dell'osso e della sua mineralizzazione. Hanno forma globosa o poliedrica e tendono a giustapporsi le une alle altre a formare lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione. Gli osteoblasti hanno dimensioni rilevanti (circa 20 $\mu$ m), un nucleo rotondeggiante eucromatico con un grande nucleolo ed un citoplasma abbondante e basofilo. Istochimicamente queste cellule si distinguono dalla positività alla reazione per l'enzima fosfatasi alcalina (ALP). Al microscopio elettronico presentano un

ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi. Nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi delimitati da membrana detti globuli calcificanti, di 0,2-0,5µm di diametro, contenenti una matrice a medio arresto elettronico in cui sono localizzati enzimi glicoproteici come l'ALP e la pirofosfatasi.

Questi non vanno confusi con i *calcifying globules* che si trovano nella matrice ossea mineralizzata e che rappresentano i nuclei iniziali di aggregazione dei cristalli. Gli osteoblasti sono uniti tra loro e con gli osteociti limitrofi, tramite le giunzioni serrate (*gap junctions*) attraverso le quali scambiano molecole segnale per la coordinazione dell'attività metabolica e la deposizione di matrice ossea.

Gli **osteociti** sono le cellule tipiche dell'osso maturo responsabili del suo mantenimento, ma anche capaci di 'innesicare' il rimaneggiamento. Sono cellule terminali con un'autonomia di vita finita, regolata da meccanismi endocrini.

L'osteocita è una cellula stellata con un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e con numerosi prolungamenti citoplasmatici. Alle estremità, i prolungamenti sono connessi con quelli degli osteociti vicini mediante giunzioni serrate, per mezzo delle quali avvengono gli scambi intercellulari di metaboliti e molecole segnale citoplasmatici. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti, e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osseo che non mineralizza. Attraverso il tessuto osteoide delle lacune e dei canalicoli ossei, ampiamente comunicanti, l'acqua e le sostanze disciolte riescono a raggiungere anche gli osteociti più distanti dai vasi sanguigni. Quando l'osteocita giunge al termine del suo ciclo vitale, ritrae i propri prolungamenti e degenera.

Gli **osteoclasti** sono cellule preposte al riassorbimento osseo. Come già riportato non sono cellule autoctone del tessuto osseo, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I preosteoclasti, infatti, originano nel midollo osseo ematopoietico dalla stessa linea differenziativa dei monociti. I precursori sono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui avvengono i processi di riassorbimento osseo. Ivi giunti, migrano nel tessuto e si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi; questi elementi sinciziali sono capaci di dissolvere la componente minerale dell'osso e di digerire enzimaticamente quella organica. Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200µm) e plurinucleate in quanto, appunto, originate dalla fusione di singoli precursori mononucleati. In una singola cellula possono essere presenti fino a 50 nuclei, con cromatina lassa e nucleolo ben evidente; il citoplasma è acidofilo. L'osteoclasto attivato aderisce alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento ed è solitamente accolto in una cavità, detta lacuna di Howship, che si forma a seguito dell'azione erosiva della cellula sull'osso. Sul versante

della cellula che si appone all'osso, è visibile il tipico orletto increspato (o a spazzola) che appare come un ispessimento della superficie cellulare con una sottile striatura perpendicolare alla superficie stessa. Con metodi istochimici, a livello dell'orletto si può rilevare la presenza dell'enzima anidraasi carbonica e di pompe a protoni.

### ***Fisiologia del tessuto osseo***

Durante la formazione del tessuto osseo sono vari i fattori di crescita morfogenetici e *pathways* a regolazione ormonale, che agiscono su fattori trascrizionali responsabili di indurre il fenotipo osteogenico. Sono stati identificati due segnali chiave nel processo di osteogenesi: il fattore di trascrizione Runx2, necessario per la formazione

embrionale dell'osso, ed il Wnt *pathway* implicato nella regolazione della morfologia, proliferazione e motilità cellulare e quindi nello sviluppo della struttura scheletrica.

Al vertice della cascata di eventi che guida il processo di differenziamento della cellula mesenchimale pluripotente a osteoblasto maturo [9] [10], c'è il gene Runx2, noto anche come Cbfa1 (Core-binding transcription factor 1). La sua espressione, inizialmente condivisa dal precursore bipotente di osteoblasti e condrociti, viene mantenuta solo nel percorso osteogenico [11], sotto il controllo regolatorio della Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) e della vitamina D3 [12] [13]. Runx2 è chiamato anche osteoblast specific factor 2, perché si lega ad un elemento *cisacting* specifico per gli osteoblasti nel promoter dell'osteocalcina. A valle di Runx2 si trova osterix (Osx), un altro importante fattore trascrizionale che compare in una fase successiva. Osx è necessario per il differenziamento del preosteoblasto in osteoblasto

funzionale, il quale esprimerà alti livelli di ALP, collagene di tipo I, *bone sialoproteins* e osteocalcina [14]. L'espressione di Osx e degli altri *markers* del fenotipo osteoblastico ora citati possono essere stimulate dalla *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) [15].

Studi *in vitro* degli ultimi anni, hanno dimostrato come il *pathway* di segnalazione Wnt sia critico per il differenziamento di cellule progenitrici in osteoblasti. L'inibizione del segnale, infatti, le può indurre ad entrare nel ciclo cellulare e così prevenire l'osteogenesi [16]. L'azione di *signalling* di Wnt si esplica in varie tappe di processo osteogenico. Le proteine Wnts, secrete dalle stesse cellule, legano complessi recettoriali di membrana associati alle proteine G (Fz e LRP5/6); l'attivazione del recettore induce il reclutamento e la stabilizzazione di fattori citoplasmatici, come la  $\beta$ -catenina, che traslocati nel nucleo regolano la trascrizione di geni del differenziamento. La  $\beta$ -catenina riveste un ruolo centrale di mediatore, per la trasmissione del segnale differenziativo indotto da Runx2. Studi *in vivo* sulla perdita di attività della molecola hanno osservato una severa osteopenia, dovuta ad un rilevante aumento degli osteoclasti, mentre la sua attivazione costitutiva risulta in un drammatico



aumento della deposizione di osso. *In vitro*, osteoblasti privi di  $\beta$ -catenina esibiscono squilibri nella maturazione e mineralizzazione, con un'elevata espressione del receptor activator of nuclear factor *kB-Ligand* (RANK-L), che è un fattore di crescita degli osteoclasti [17].

E' stato dimostrato, inoltre, come la  $\beta$ -catenina agisca al livello di questo *pathway* in sinergia con la BMP-2, stimolando l'attività dell'ALP e l'espressione degli altri marcatori osteoblastici. Nei preosteoblasti la BMP-2 aumenta la presenza di  $\beta$ -catenina nel nucleo e induce l'espressione di varie proteine della famiglia Wnt [18]. Quello delle Wnts è quindi un *loop* autocrino fondamentale per il controllo biologico dello sviluppo in senso osteoblastico.

Tra i fattori regolatori solubili prodotti dagli osteoblasti, forse il più studiato è il transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), che appartiene alla stessa famiglia delle BMPs. Questo fattore di crescita, con azione paracrina ed autocrina, ne regola altri che favoriscono lo sviluppo del fenotipo ed il metabolismo degli osteoblasti maturi. Il

TGF-  $\beta$  viene secreto in forma di precursore inattivo e reso funzionale in seguito, da proteasi extracellulari. Gli osteoblasti sintetizzano anche gli Insuline-like growth factors (IGFs), proteine con una spiccata azione stimolatoria sulla propria attività 30 cellulare. Un ruolo importante è svolto anche da ormoni come il PTH, che svolge una duplice azione di formazione e riassorbimento osseo. PTH è in grado di attivare il sistema osteoprotegerina (OPG)/RANK-L, sostenendo l'azione antiassorbitiva di OPG e stimolando la funzione osteoblastica (attività anabolizzante) in colture d'organo [19].

Gli osteoblasti sono, inoltre, responsabili della produzione dei costituenti della matrice organica extracellulare, quali il collagene di tipo I e le proteine non collageniche. Una volta che la matrice extracellulare viene secreta va incontro a mineralizzazione: l'accumulo del minerale è rapido, raggiungendo il 70% della densità in pochi giorni (mineralizzazione primaria). Tuttavia la deposizione di piccoli cristalli minerali continua lentamente per mesi (mineralizzazione secondaria). Gli osteoblasti, richiamati nei siti di formazione ossea da citochine e fattori di crescita, dopo la secrezione della matrice rimangono inglobati in essa, prendendo il nome di osteociti. Il corpo degli osteociti rimane racchiuso in una nicchia scavata nella sostanza intercellulare, la lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula mentre i prolungamenti sono accolti all'interno di sottili canali scavati nel tessuto, chiamati canalicoli ossei.

Gli osteoblasti sono coinvolti anche nel processo di rimaneggiamento osseo. Sono infatti in grado di innescare il riassorbimento della matrice ossea sia indirettamente, in quanto producono attivatori degli osteoclasti come RANK-L e M-CSF (*Monocyte colony stimulating factor*), sia in modo diretto secernendo enzimi proteolitici che ne scindono la componente organica. Tra questi vi è la

collagenasi, secreta in forma inattiva (procollagenasi) e resa operativa nell'ambiente extracellulare dopo il clivaggio proteolitico da parte della plasmina. La collagenasi agisce rimuovendo lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie dell'osso, consentendo agli osteoclasti di aderire alla matrice minerale e dissolverla. Il riassorbimento della matrice da parte di questi ultimi, inizia con la dissoluzione della componente minerale dovuta all'acidificazione del microambiente nella zona di adesione all'osso. Al livello della zona sigillata l'anidrasi carbonica degli osteoclasti, genera acido carbonico a partire da CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O; le pompe di membrana sull'orletto increspato trasportano attivamente i protoni (della dissociazione di acidi organici come carbonico, citrico e lattico..) nell'ambiente extracellulare. L'abbassamento del pH che ne consegue, porta alla dissoluzione dei cristalli di apatite. Nel contempo gli osteoclasti esocitano il contenuto degli enzimi lisosomiali all'esterno: a basso pH le idrolasi lisosomiali si attivano e digeriscono anche i componenti organici della matrice ossea. L'azione litica degli osteoclasti si manifesta con la formazione della lacuna di Howship. Una volta formata la lacuna gli osteoclasti si staccano dalla matrice e, con moto ameboide, si spostano sulla porzione di osso adiacente a quella riassorbita, iniziando la formazione di una nuova lacuna.

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori locali e ormonali. In particolare, queste sono le uniche cellule dell'osso che possiedono il recettore per la calcitonina, ormone prodotto dalle cellule parafollicolari (cellule C) della tiroide e antagonista del paratormone. La calcitonina è un inibitore del riassorbimento osseo in quanto è capace di indurre il distacco degli osteoclasti dall'osso, la scomparsa dell'orletto a spazzola e la riduzione del metabolismo cellulare. Il recettore per la molecola è espresso già nei precursori circolanti degli osteoclasti, tanto che viene utilizzato come discriminante per l'identificazione di questo tipo cellulare. Tuttavia i preosteoclasti non esprimono il recettore per il paratormone, la cui azione osteolitica sembra esplicarsi attraverso gli osteoblasti. Stimolati dall'ormone, questi ultimi si ritiene che liberino fattori solubili detti *Osteoclast Activating Factors* (OAF), i quali attivano gli osteoclasti ad iniziare il riassorbimento. La natura chimica degli OAF non è ancora del tutto nota: probabilmente alcuni di questi appartengono alla famiglia

delle BMPs (la BMP-2 è un potente attivatore osteoclastico *in vitro*). Questa ipotesi sembra avvalorata dai risultati sperimentali *in vitro* che dimostrano come fattori quali il paratormone, la vitamina D e alcune citochine siano incapaci di stimolare gli osteoclasti a riassorbire l'osso, a meno che non siano mantenuti in coltura con gli osteoblasti [20]. Un OAF identificato recentemente è RANK-L, appartenente al sistema di recettori e ligandi OPG/RANK-L/RANK e oggi ritenuto fondamentale nella regolazione del processo di osteoclastogenesi. RANK-L lega il recettore RANK

espresso sulle membrane cellulari dei precursori osteoclastici, 32 promuovendone il differenziamento e la maturazione. OPG, prodotta dagli osteoblasti, svolge il ruolo di recettore solubile di RANK-L inibendo l'osteoclastogenesi [21]. Sono stati evidenziati anche altri ormoni e fattori locali in grado di influenzare l'osteoclastogenesi e l'attività degli osteoclasti maturi, interferendo con il sistema OPG/RANK-L/RANK [22]. Tra questi, il già menzionato PTH legandosi ai recettori degli osteoblasti determina un incremento della sintesi di RANK-L e la conseguente maturazione delle cellule preosteoclastiche in osteoclasti maturi.

### ***Il processo riparativo dell'osso***

La riparazione endogena di lacune ossee è un evento fisiologico. Il tessuto osseo è in continuo rimodellamento: l'osteogenesi avviene durante la vita fetale dell'individuo e consiste essenzialmente nella trasformazione di parti primitivamente costituite da tessuto connettivo (ossificazione connettivale o membranosa) o da tessuto cartilagineo (ossificazione condrale).

Nell'ossificazione membranosa si osserva, in corrispondenza del centro di ossificazione, un aumento della vascolarizzazione ed un accumulo di cellule mesenchimali in prossimità dei capillari. Da esse originano gli osteoblasti che dopo aver secreto matrice e sui cui depositano sali di calcio, rimangono imprigionati nella

sostanza fondamentale trasformandosi in osteociti. Altre cellule mesenchimali evolvono in cellule del midollo osseo, che si differenziano durante la vita dell'individuo.

L'ossificazione pericondrale è molto simile a quella connettivale e spesso i due fenomeni si verificano contemporaneamente in un segmento osseo in formazione.

L'ossificazione endocondrale porta alla costruzione di tessuto osseo attorno a quello cartilagineo preesistente, come nei segmenti diafisari delle ossa lunghe. La cartilagine attorno alla quale si forma il nuovo tessuto osseo viene poi progressivamente disgregata ad opera di cellule dette condroclasti. Gli spazi rimasti vuoti a seguito dell'erosione della cartilagine vengono successivamente occupati dalle cellule staminali che daranno origine al midollo osseo, dotato di attività ematopoietica.

In seguito a questi processi si forma tessuto osseo fibroso a fibre intrecciate (non lamellare). L'osso fibroso viene progressivamente sostituito con tessuto osseo secondario, ottenuto mediante l'erosione di quello primario e la deposizione di nuovo materiale grazie all'azione erosiva congiunta di osteoclasti ed osteoblasti. Tale processo continua anche nell'individuo adulto dove il rimodellamento porta ad un perfezionamento strutturale del tessuto in base alle tensioni ed ai carichi cui è sottoposto.

Nei processi riparativi si ripete la sequenza di eventi della normale istogenesi dell'osso. Nell'ossificazione intramembranosa si possono distinguere due fasi osteogeniche distinte: l'osteogenesi statica, diretta principalmente da fattori induttivi come l'endotelina I e l'*Epidermal Growth Factor* e l'osteogenesi dinamica, diretta soprattutto da segnali meccanici [23]. Quella statica è un processo meccanico-dipendente di neo-osteogenesi che avviene o in un tessuto di natura mesenchimale o in un callo fibroso, privo di osso preesistente e quindi di osteociti che possano fungere da meccanorecettori. L'osteogenesi dinamica invece ha luogo su superfici ossee preesistenti, dove fattori meccanici innescano ed influenzano la deposizione ossea da parte degli osteoblasti. Nell'osteogenesi meccanico-dipendente svolgono un ruolo fondamentale le citochine ed i fattori di crescita, di origine vascolare ed ematica.

Il processo di riparazione delle fratture è un modello guida utile per cercare di sviluppare una terapia razionale per la rigenerazione dell'osso. La riparazione di una frattura avviene inizialmente con la formazione di un ematoma, conseguente al trauma, dovuto alla rottura dei vasi. Successivamente si formano nuovi vasi a partire da quelli preesistenti (angiogenesi) e vengono reclutate cellule dell'infiammazione, fibroblasti e cellule staminali. Le cellule infiammatorie liberano fattori di crescita e citochine che svolgono un ruolo importante nella riparazione. Si forma così tessuto di granulazione, gradualmente rimpiazzato da fibrocartilagine e un callo esterno mediante ossificazione intramembranosa; solo in seguito viene mineralizzato il callo interno. Infine, come nel rimodellamento osseo fisiologico, il callo dovuto alla frattura è rimpiazzato con osso secondario lamellare ed il supporto vascolare ritorna normale. Il ruolo dell'ematoma è fondamentale per la riparazione ossea poiché permette l'innescò della rigenerazione, dall'esterno dell'osso verso la zona midollare. E' stato infatti osservato come la rimozione dell'ematoma diminuisca significativamente la riparazione, mentre il suo trapianto accelera la deposizione di osso nuovo [24] [25].

FIG 4: Fasi della riparazione di una frattura: (a) formazione dell'ematoma, (b) formazione di osso spugnoso nelle zone vicine ai vasi neoformati e di fibrocartilagine in quelli più distanti, (c) sostituzione della fibrocartilagine con il callo osseo, (d) rimodellamento finale.

## **IMPIANTI, SUPERFICI IMPLANTARI E QUALITA' OSSEA**

### **INTRODUZIONE:**

Obiettivo principale in implantoprotesi è la sostituzione protesica di elementi dentari mancanti con impianti inseriti in un supporto osseo adeguato. Affinché siano garantite le condizioni base, in altre parole l'osteointegrazione del supporto (rappresentato dall'impianto) e l'equilibrio biomeccanico tra

le due componenti (elemento protesico e impianto), bisogna avere a disposizione un sufficiente volume di osso alveolare per l'inserimento della fixture. Possiamo dunque affermare che esistono delle condizioni ideali per il posizionamento corretto di un impianto. Ovviamente, in pazienti apparentemente sani (anamnesi per malattie endocrine gravi e dismetaboliche scompensate negativa; assenza di terapia radiante nella regione cervico-facciale; non fumatore; non abuso di alcol; assenza di malattia parodontale, parafunzioni gravi, lichen, leucoplachie; buone condizioni di igiene) i fattori favorenti una riabilitazione implantare sono:

1. altezza ossea (cresta alveolare/osso basale) maggiore uguale a 10 mm;
2. spessore pari a 5-6 mm, con pareti integre che possano contenere completamente tutta la superficie dell'impianto;
3. corretti rapporti intermascellari in tutte le direzioni dello spazio: antero-posteriore, trasversale e verticale;
4. adeguatezza dei tessuti molli, più precisamente della banda di mucosa cheratinizzata.

E' però osservabile come, con la perdita degli elementi dentari, l'osso alveolare vada incontro ad un riassorbimento più o meno rapido. Questo fenomeno, a parere comune di molti autori, è legato alla perdita della sollecitazione meccanica trasmessa dalle radici dentarie. A tale proposito esiste la classificazione di Cawood e Howell del 1988 [26] che mette in evidenza come in realtà l'osso basale non cambia forma in modo significativo, probabilmente perché, data l'assenza degli elementi dentari, l'unico stimolo funzionale delle basi ossee edentule è dato dalla presenza delle inserzioni muscolari. Al contrario, il processo alveolare subisce delle modificazioni morfologiche ben predicibili. Questo tipo di riassorbimento è sito-specifico, ovvero cambia da regione a regione all'interno delle diverse aree dei mascellari. Non approfondiremo la discussione su tale classificazione, che non rappresenta l'argomento di questo volume, ma ci limitiamo ad evidenziare come il cambiamento dei rapporti scheletrici tra le due arcate coinvolga i tre piani dello spazio: trasversalmente il mascellare superiore diventa progressivamente più stretto, mentre l'osso mandibolare diventa più largo; in senso antero-posteriore tutte e due le arcate diventano più corte; verticalmente la distanza interarcata aumenta. C'è da tenere presente che in quest'ultimo caso si ha una anterotazione di compensazione a livello mandibolare, che aumenta il progenismo senile.

Quando ci troviamo di fronte alla programmazione di un intervento implantare non basta però parlare soltanto della quantità di osso, se cioè il suo volume sia o meno sufficiente per il posizionamento della fixture: occorre invece necessariamente avere informazioni sulla qualità dell'osso dove noi andremo ad intervenire chirurgicamente. L'importanza di questo parametro è evidenziata dalla sua stessa definizione: per qualità ossea, infatti, si intende la capacità dell'osso di

soportare i carichi e di conseguenza anche il carico implantare. Da quanto esposto risulta evidente il motivo per il quale la valutazione della qualità ossea a livello del sito chirurgico sul quale si deve intervenire consente di predire il grado di successo dell'impianto anche a distanza, in termini di resistenza alle forze di carico e anche di osteointegrazione. La sua corretta valutazione passa attraverso la media delle tre componenti meccaniche dell'osso, ovvero contenuto minerale, spessore corticale e struttura trabecolare. Anche per la qualità ossea, a supporto del professionista, vi sono diverse classificazioni. La più utilizzata da un punto di vista clinico è quella di Lekholm e Zarb (1985).

I CLASSE (D1) -L'intero complesso maxillo-mandibolare è composto da osso compatto omogeneo (tipica è la zona della sinfisi mentoniera). Tuttavia, al contrario di quanto si potrebbe pensare, esso non rappresenta il tipo di osso ideale al posizionamento di un impianto; questo è legato in parte alle caratteristiche stesse dell'osso la cui vascolarizzazione locale risulta ridotta; in parte al fatto che, proprio per la sua compattezza, la preparazione del sito osteotomico potrebbe necessitare un eccessivo surriscaldamento dello stesso da parte degli strumenti rotanti.

II CLASSE (D2)-Troviamo uno spesso strato di osso compatto che circonda un nucleo di osso trabecolare denso. Rappresenta la condizione ideale per il posizionamento di un impianto, infatti, la sufficiente corticalizzazione e la densità della spongiosa garantiscono la stabilità primaria degli impianti.

III CLASSE (D3)-Si evidenzia un sottile strato di osso compatto circondato da un nucleo di osso trabecolare di scarsa densità ma di quantità sufficiente. E' ancora una situazione accettabile per l'inserzione di un impianto: vi è presente infatti un endostio di discreta qualità e ben vascolarizzato e una corticale ancora discretamente rappresentata. Clinicamente percepiremo una più facile penetrazione della fresa nell'osso dovuta alla minore densità della midollare.

IV CLASSE (D4)-Vi è un sottile strato di osso compatto che circonda un nucleo di osso trabecolare di bassa densità e qualità, con trabecole sottili e diradate. In questi casi è consigliabile il sottodimensionamento della preparazione del sito implantare oppure la sua preparazione con osteotomi per una maggiore compattazione dell'osso stesso. Questa è comunque considerata una condizione sfavorevole per il posizionamento di una fixture.

Il grande limite di questa classificazione è di essere operatore-dipendente per cui il suo impiego risulta molto soggettivo e richiede esperienza.

Esiste inoltre la classificazione di Hounsfield e Misch (tabella 1), meno soggettiva, che suddivide sempre la qualità ossea in D1-D2-D3-D4, ma in base alle unità Hounsfield rilevate in occasione dell'indagine TC pre-implantare.

<b>DENSITA' OSSEA SECONDO HOUNSFIELD E MISCH</b>		
<b>Unità Hounsfield</b>		<b>Classificazione secondo Misch</b>
<b>1600</b>	Osso corticale	<b>D1 – D2</b>
<b>800</b>	Qualità eccellente	<b>D2</b>
<b>600</b>	Densità discreta	<b>D3</b>
<b>200</b>	Densità minima	<b>D4</b>
<b>60</b>	Coagulo sanguigno	
<b>0</b>	Densità acqua	
<b>- 100</b>	Densità tessuto adiposo	
<b>-1000</b>	Densità aria	

**Tabella 1:** Classificazione di Hounsfield e Misch

L'impiego della classificazione di Hounsfield e Misch richiede l'esecuzione preliminare di una indagine TC. Inoltre, anche in questo caso la valutazione non è esente da una certa soggettività, che riguarda anche la modalità di scelta della zona ossea di cui si misura la densità radiografica.

Concludendo dobbiamo chiederci quali armi l'implantologo ha a disposizione per ottenere un successo anche in una situazione clinica dove il tessuto osseo sia di scarsa qualità. Dando per scontato la corretta diagnosi ed la corretta impostazione dell'iter impianto-protetico, gli autori pensano che sia importante soffermarsi a fare delle considerazioni sull'impianto in modo da poter scegliere la fixture che mi consenta di ottenere il maggior contatto osso impianto e di conseguenza maggior probabilità di successo.

### **BREVI CONSIDERAZIONI BIOLOGICHE: OSTEOINTEGRAZIONE**

In questo paragrafo faremo solamente un breve cenno di quelle quelle che sono le basi biologiche dell'osteointegrazione, che saranno più ampiamente trattate nel capitolo successivo.

Il concetto di osteointegrazione è definito in base a valutazioni istologiche piuttosto che radiologiche o cliniche. Brånemark, infatti, concepisce l'osteointegrazione come una connessione diretta tra l'osso vivente e la superficie di un impianto sottoposto a carico, senza interposizione di tessuto connettivo, sulla base del potere di risoluzione della microscopia ottica. Secondo Boyne, è corretto parlare di osteointegrazione quando l'impianto è interamente integrato in un tessuto osseo completo di tutte le sue componenti (lacune vascolari, tessuto emopoietico, tessuto grasso, tessuto connettivo, matrice calcificata) e, pertanto, l'ancoraggio intimo tra la matrice ossea e la superficie dell'impianto non risulterà mai totale. Meffert ridefinì e suddivise il concetto di osteointegrazione in osteointegrazione adattabile, qualora il tessuto fosse contiguo alla superficie impiantare, e in biointegrazione, quando fosse possibile individuare un connessione biochimica diretta osso-

impianto. Più recentemente è stata suggerita da Zarb e Albrektsson una definizione su base clinica secondo cui l'osteointegrazione è un processo in cui materiali alloplastici ottengono una fissazione rigida, clinicamente asintomatica con l'osso e tale fissazione rigida viene mantenuta anche sotto carico. Il requisito fondamentale per stabilire una osteointegrazione reale e durevole da parte di un materiale non biologico si basa sulla biocompatibilità del materiale da impianto, sulla biomeccanica dell'impianto stesso, sulla corretta preparazione chirurgica del sito ricevente e sul controllo dei carichi protesici.

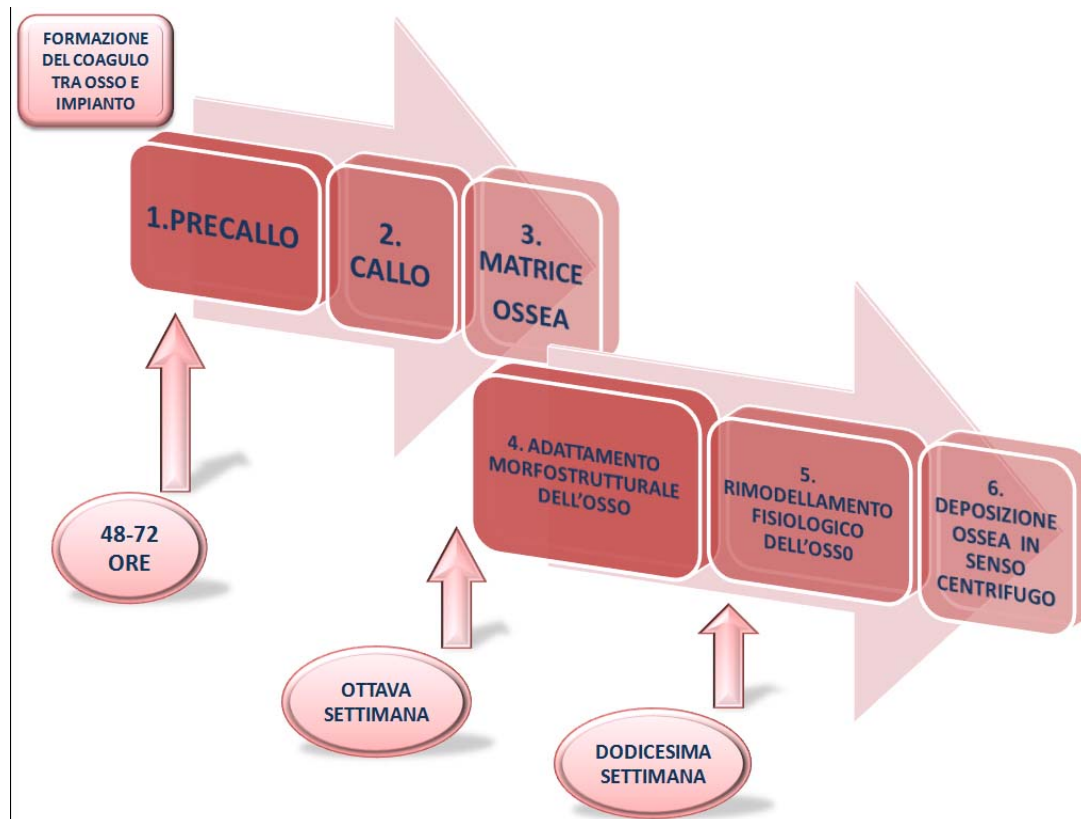
Per quanto riguarda la fase chirurgica di inserimento, gli impianti devono essere inseriti con tecnica atraumatica, evitando cioè il surriscaldamento dell'osso durante la preparazione del sito ricevente. Immediatamente dopo l'inserimento della fixture si verifica la formazione di un ematoma nella microcavità compresa tra l'impianto e l'osso che si presenta, seppur in misura minima, danneggiato dall'inevitabile trauma termico e meccanico. Durante il periodo di guarigione l'ematoma si trasforma in nuovo osso attraverso la formazione di un callo. L'osso danneggiato subisce una rivascolarizzazione ed un processo di rimodellamento. Successivamente il tessuto osseo vitale è in diretto contatto sia macro che microscopicamente con la superficie dell'impianto senza alcuna interposizione di tessuti molli. Nei preparati si vedono le cellule ossee di neoformazione che si addensano in prossimità del titanio, risultandone quasi a contatto attraverso i loro prolungamenti, mentre i sistemi di Havers risultano ben allineati lungo la parete della fixture. E' inoltre fondamentale ricercare in fase di inserimento una adeguata stabilità primaria: tale considerazione risulta imprescindibile per il successo anche nei casi in cui si ricerchi la rigenerazione di osso all'interno di difetti periimplantari residui. Il mancato rispetto delle linee guida suddette può portare ad una pseudointegrazione, cioè ad una incompleta connessione tra osso e struttura dell'impianto, mentre ad integrazione avvenuta è una adeguata sollecitazione funzionale a fornire il necessario stimolo per un continuo rimodellamento del tessuto osseo che accoglie gli impianti funzionanti come ancoraggio protesico.

#### SCHEMA PROCESSO DI OSTEOINTEGRAZIONE:

1. Formazione del coagulo tra osso e impianto
2. Costituzione, dopo 48-72 ore, del precallo (fibroblasti e tessuto fibroso)
3. Il precallo si arricchisce di tessuto connettivo compatto e di cellule mesenchimali, che si differenziano in osteoblasti e fibroblasti, diventando callo
4. Gli osteoclasti producono fibre osteogenetiche passibili di calcificazione, generando quella matrice ossea che maturerà in osso neoformato



5. All'ottava settimana post-chirurgica l'attività osteogenica si riduce, mentre processi di rimodellamento conducono all'adattamento morfostrutturale dell'osso neoformato all'impianto
6. Dopo 12 settimane l'impianto viene caricato e, sottoposto alle forze oclusali, il tessuto osseo neoformato periimplantare inizia il fisiologico rimodellamento che porta alla formazione di uno strato di corticale ossea lungo tutta la superficie della fixture
7. Conseguono una deposizione ossea in senso centrifugo attorno all'impianto



## CONCLUSIONI:

Nel processo di osteointegrazione, due fattori svolgono un ruolo importante: la stabilità primaria (stabilità meccanica) e la stabilità secondaria (stabilità biologica dopo il rimodellamento dell'osso) dell'impianto nell'osso. Con le superfici tradizionali, gli impianti sono esposti a un maggiore rischio di rottura, dovuta a una perdita generale di stabilità tra la seconda e la quarta settimana.

### **Stabilità primaria:**

Non appena si inserisce un impianto nell'osso mascellare, alcune aree della superficie entrano a contatto diretto con l'osso. Questo contatto è chiamato stabilità primaria o meccanica e dipende dalla forma dell'impianto, dalla qualità dell'osso e dalla preparazione del letto implantare. La stabilità primaria diminuisce gradualmente nel processo di rimodellamento dell'osso.

### **Stabilità secondaria:**

Nel processo di guarigione, l'osso è rimodellato e forma nuove aree di contatto con la superficie implantare. Questo nuovo contatto con l'osso è chiamato stabilità secondaria o biologica. Quando il processo di guarigione è terminato, la stabilità meccanica iniziale è completamente sostituita dalla stabilità biologica.

E' dunque evidente come l'impianto di per se abbia un ruolo fondamentale in questo processo, e di conseguenza sul successo finale del nostro operato impianto-protetico. Percui, diventa obbligatorio fare delle considerazioni sull'impianto.

## **CONSIDERAZIONI SULL'IMPIANTO**

### **1. forma**

Come mostra la letteratura la forma dell'impianto non influisce sul processo di osteointegrazione. Infatti, lavori sperimentali su scimmie condotti da Boyne e Scheer, i quali hanno testato diverse morfologie di impianto (cilindrici, filettati, a castello), mostrano come non diversificano l'organizzazione del tessuto periimplantare. Dunque, le dimensioni e la macromorfologia della fixture non influiscono qualitativamente nell'ancoraggio tessutale e, quindi nel conseguimento non solo di una idonea stabilità primaria ma anche di una reale osteointegrazione.

Un discorso diverso è legato alla sopravvivenza a lungo termine del nostro impianto. Infatti, è ovvio che la morfologia della fixture sia correlata a tale dato. La forma infatti risulta fondamentale per il passaggio delle forze dall'impianto all'osso circostante. Tale passaggio indurrà un processo di rimodellamento osseo. Durante la fase di stabilità secondaria tale processo diventa fondamentale per migliorare le caratteristiche di resistenza meccanica e di vascolarizzazione dell'osso periimplantare.

Biomeccanicamente gli impianti sono diversi rispetto al dente naturale. Come abbiamo visto, mentre il dente naturale è ancorato all'osso in maniera elastica tramite le fibre del legamento parodontale, l'impianto è unito all'osso tramite un'anchilosi. Così vi è una preclusione del movimento tra impianto e osso circostante, e dunque questo rapporto di anchilosi sarà il responsabile del passaggio delle forze. Attorno all'impianto osteointegrato l'osso si depositerà anche all'interno delle microrugosità presenti sulla superficie. Per ottenere una elevata BIC, risulta importante che le forze siano distribuite in tutte le direzioni senza che vi sia nessun movimento tra l'interfaccia osso-superficie implantare. Misch CE (1999) mostra come anche quando forze verticali fisiologiche di 100 N e di 10 N orizzontali sono applicate su impianti, il picchi di stress più alti sono presenti a livelli della corticale, mentre non sono scaricate forze a livello dell'osso midollare, in quanto la rigidità dell'osso corticale risulta essere 10 volte maggiore di quella dell'osso midollare.

Questo spiega il perché la forma e l'altezza dell'impianto non siano una discriminante in osso di tipo 1 e 2. Quando invece gli impianti sono posizionati in osso di tipo 4, dove la corticale è assottigliata o addirittura in alcuni casi assente, esso si ritrova inglobato per la maggior parte da osso midollare isoelastico. Come conseguenza avremo che le forze saranno distribuite uniformemente fino alla fine dell'impianto. In questi casi, dove abbiamo un osso di tipo 4, la forma dell'impianto e la distribuzione delle forze generate hanno un ruolo importante (Meyer U 2001).

Il mascellare posteriore è particolarmente esposto ad elevate forze masticatorie. Inoltre, il tipo di osso ha generalmente una bassa densità e spesso il suo volume è insufficiente per il posizionamento di impianti. Di conseguenza riuscire a garantire il posizionamento di impianti con una superficie più ampia ci consentirà di riuscire a distribuire correttamente all'osso circostante le forze generate in questa regione. Teniamo ben presente che le forze che agiscono sui denti posteriori sono circa 300% maggiori di quelle che agiscono sui denti anteriori. Questo spiega il perché si posiziona un numero maggiore di impianti in questa zona e il perché essi saranno il più possibile larghi e lunghi.

Uno studio sperimentale su babuini di Watzak G (2003), in cui sono stati utilizzati impianti filettati (screw-shape) ed impianti cilindrici non filettati in mascellare posteriore (osso tipo 4), ha mostrato che, ad un anno dal carico, il BIC era chiaramente superiore attorno al primo tipo rispetto a quelli cilindrici non filettati. Questo suggerisce che in osso di tipo 4 è consigliabile utilizzare impianti screw-shape.

### **1.a. impianti conici:**

Questo tipo di impianto è nato per la sostituzioni di elementi dentari immediatamente dopo la loro estrazione (impianti post-estrattivi). La conicità dell'impianto permette di avere un aumento della stabilità primaria della fixture appena inserita. Questo ci suggerisce come tale forma sia ideale per un osso di scarsa qualità come può esserlo quello di tipo 4.

### **1.b. impianti cilindrici:**

Il design dell'impianto cilindrico che solitamente viene utilizzato in osso di scarsa qualità ha il collo per la maggior parte più ampio rispetto al corpo per migliorare la stabilità primaria. Inoltre la stabilità in osso di tipo 4 con impianti con questa geometria può essere aumentata aumentando il diametro dell'impianto che si utilizza. Aumentare la larghezza dell'impianto ha due vantaggi:

1. aumenta l'area di contatto osso impianto;
2. aumenta la rigidità dell'impianto, e di conseguenza migliora la distribuzione delle forze sull'osso circostante.

Bisogna tenere però anche presente che la gestione di piattaforme così grandi comporta un numero maggiore di passaggi, di conseguenza c'è una potenzialità maggiore di errori.

## **2. la superficie**

La microstruttura della superficie, Zechner (2003), è uno tra i fattori più importanti in tutto il processo di osteointegrazione. Il titanio commercialmente puro è caratterizzato da una eccellente biocompatibilità. Impianti con superficie macchinata hanno mostrato sostanzialmente una minore BIC in osso di scarsa qualità comparati con impianti con superficie trattata. Studi sperimentali di Davis (1996) mostrano come le superfici trattate favoriscano un incremento di formazione ossea.

E' stato dimostrato come intorno a questo tipo di superficie vi sia una interfaccia di materiale amorfo, prevalentemente costituito da proteoglicani e glicosamidi, tra 20 e 40 nm. Tale sostanza, come dimostrato da Albrektsson T (1986), si adatta alle irregolarità di superficie di 1-100 micron.

Si comprende come questo parametro sia fondamentale per il clinico nell'intento di raggiungere il successo anche in situazioni dove l'osso in cui si opera risulta essere di scarsa qualità. Infatti, riuscire a svolgere una attività chirurgica-implantare in pazienti che presentano una qualità ossea scarsa rappresenta ormai la quotidianità. Avere a disposizione impianti che favoriscono il processo di guarigione osseo intorno ad essi è di fondamentale importanza. Penso che questo rappresenti l'arma migliore a nostra disposizione per intervenire in soggetti con osso di tipo 4 potendo garantire una percentuale di sopravvivenza della fixture sovrapponibile a quella di pazienti che presentano un osso di buona qualità.

Per questi motivi di seguito portiamo un esempio di evoluzione delle biotecnologie applicata all'implantologia, per la realizzazione di una nuova superficie trattata al laser, per l'ottenimento di grandi risultati anche in osso di tipo 4.

### **L'EVOLUZIONE DELLA SUPERFICIE IMPLANTARE:**

#### **IL TRATTAMENTO AL LASER**

*Ricerca bibliografica e brevettale per definire lo stato dell'arte riguardo alla possibilità di sviluppare una metodica di irruvidimento controllato della superficie degli impianti dentali in titanio*

Nel campo dell'implantologia, ed in particolare dell'implantologia orale, è noto che la risposta cellulare del tessuto ospite è influenzata dalla rugosità superficiale dell'impianto (1-3).

E' stato infatti dimostrato che la microtopografia superficiale dell'impianto influenza l'adesione, la proliferazione, la crescita, la migrazione, l'orientamento e la differenziazione delle cellule del tessuto ospite.

Gli studi condotti hanno dimostrato che superfici microlavorate, caratterizzate da un controllo della struttura superficiale più preciso di quello consentito dalle comuni tecniche di irruvidimento

superficiale (sabbiatura, mordenzatura, plasma-spray), migliorano e accelerano l'integrazione di un dispositivo medico nel tessuto circostante.

I trattamenti più diffusi (sabbiatura, mordenzatura, plasma spraying e combinazioni) producono topografia irregolare magari con le dimensioni ottimali, ma con una rugosità ripetibile solo se quantificata con metodi di misura statici. Quest'ultimo è un pre-requisito per ottimizzare l'interazione dell'impianto con i tessuti circostanti (4). E' altamente probabile che superfici maggiormente controllate migliorino ed accelerino l'integrazione di un impianto nel tessuto circostante (4).

Lo scopo del progetto di questa ricerca era quindi lo sviluppo di un metodo di trattamento superficiale in grado di consentire caratteristiche morfologiche ripetibili e controllate a livello micrometrico, in grado di ottimizzare la risposta del tessuto circostante al dispositivo, senza introdurre nel contempo contaminazioni chimiche o alterare lo strato superficiale di ossido di titanio che garantisce la biocompatibilità, problemi che possono derivare invece dai trattamenti superficiali più diffusi (5,6)

Le tecniche di irruvidimento superficiale che consentono il controllo sia della dimensione delle porosità create sia quella della loro distribuzione sono sostanzialmente di due tipi:

- Tecniche litografiche (foto- ed elettrolitografiche)
- Tecniche basate sull'utilizzo del laser

Dal momento che le tecniche litografiche sono generalmente molto lente (in alcuni casi sono necessarie anche molte ore per trattare 1 cm<sup>2</sup> di superficie) e difficili da applicare a superfici non planari la ricerca è stata focalizzata sull'irruvidimento mediante laser. Dalla consultazione della letteratura scientifica sull'argomento risultava evidente la possibilità di irruvidire la superficie degli impianti in titanio mediante laser di tipo diverso (Nd:YAG, Nd:vetro, laser ad eccimeri) (7). In tutti i casi le superfici ottenute risultavano considerevolmente più pulite rispetto a superfici trattate con metodi convenzionali. Tuttavia l'applicabilità a livello industriale dei sistemi proposti nelle varie pubblicazioni per realizzare l'irruvidimento controllato della superficie era molto limitata dal momento che per controllare dimensioni e distribuzione delle porosità indotte era necessario ricorrere a sistemi molto complessi operando sotto vuoto. Infatti i laser Nd:YAG e Nd:Glass impulsati sono caratterizzati da energie elevate di impulso e bassa qualità ottica del fascio e quindi hanno limiti sulle dimensioni inferiori dei fori e comunque, a causa della cadenza bassa di impulso hanno enormi limiti sulla produttività (8, 9). Inoltre laser di questo tipo sono caratterizzati da impulsi lunghi (micro o millisecondi) per cui prevale la fusione sulla vaporizzazione del materiale. I laser ad eccimeri sono sicuramente competitivi dal punto di vista della capacità produttiva, ma per

fornire risultati in termini di controllo delle dimensioni e della distribuzione delle porosità richiedono di essere utilizzati con l'ausilio di una maschera che riporta il pattern da realizzare e questo risulta ovviamente di difficile applicabilità nel caso in cui si trattano dispositivi molto piccoli e con geometrie complesse come gli impianti dentali (6).

Da quanto sopra riportato risultava evidente la necessità di sviluppare un'attività di ricerca sia per individuare il tipo di tecnologia laser in grado di realizzare sulla superficie degli impianti dentali porosità micrometriche di dimensioni e distribuzione controllata in tempi e con attrezzature compatibili con la produzione industriale.

Un altro aspetto da approfondire nel corso del progetto di ricerca era inoltre quello legato all'individuazione delle caratteristiche ottimali del patterning (dimensione, profondità fori e spaziatura) in grado di promuovere la migliore osteointegrazione.

Vista infatti la carenza di tecniche in grado di irruvidire in modo controllato la superficie del titanio, erano pochi gli studi scientifici che fornivano indicazioni su come le varie geometrie influenzassero l'adesione del tessuto osseo alla superficie dell'impianto in titanio. Era quindi necessario sviluppare un'attività di ricerca approfondita per studiare anche questi aspetti.

### **Q-Switching e Diode-pumped**

L'emissione in regime di Q Switching (Q-Sw) è una tecnica che permette di generare impulsi di breve durata (alcune decine di nanosecondi, 10<sup>-9</sup>s) ed elevata potenza di picco (alcune decine di megawatt, 10<sup>6</sup>W). Durante il pompaggio, un opportuno dispositivo impedisce l'oscillazione laser imponendo alte perdite in cavità. In questo modo l'inversione di popolazione raggiunge un valore molto elevato. Infatti il pompaggio continua ad eccitare elettroni che non ritornano al livello inferiore in quanto l'emissione stimolata è bloccata dal dispositivo. Quando il dispositivo viene aperto bruscamente (basse perdite in cavità) il laser si trova ad avere istantaneamente un alto guadagno, e l'energia accumulata nella prima fase si converte rapidamente in un impulso breve ed intenso. Affinché l'energia di pompaggio, invece di essere accumulata, non vada persa per emissione spontanea, è necessario che la vita media del livello laser superiore sia sufficientemente lunga (frazioni di millisecondo). Il dispositivo utilizzato per generare il Q-Switch è un modulatore acusto-ottico

I DPSS sono laser in regime di Q-Sw il cui pompaggio avviene mediante un altro laser (diodo). Rispetto al pompaggio tradizionale a lampada, quello a diodi permette un'efficienza maggiore (a

causa della stretta riga di emissione tipica di un laser, tutta la radiazione viene spesa per creare l'inversione di popolazione, mentre l'ampio spettro di emissione della lampada "spreca" molta energia nell'eccitazione di livelli non interessanti) e ciò si traduce in basse perdite termiche e quindi in alte potenze con ottime qualità ottiche del laser.

L'uso dei laser di ultima generazione permette dunque di raccogliere una serie di proprietà particolarmente appetibili da un punto di vista scientifico ed industriale: sono caratterizzati da velocità molto elevate, alta flessibilità nella tipologia di lavorazione. E' infatti possibile realizzare microlavorazioni precise e ripetibili con tolleranze micrometriche su ogni tipo di materiale, si raggiungono fattori di forma (spessore/dimensione) superiori a 100:1 e cosa molto importante si riescono ad eseguire lavorazioni anche molto inclinate rispetto alla superficie.

Altro aspetto estremamente interessante dei laser DPSS in regime Q-sw è il fatto il materiale rimosso viene rimosso dalla superficie sotto forma di vapore e questa ablazione "fredda" assicura una lavorazione "pulita" senza zone termicamente alterate, senza formazione di cricche e con elevata ripetibilità del processo. Nel trattamento con i laser tradizionali invece la durata dell'impulso varia dai microsecondi ai millisecondi e il calore ha quindi il tempo di diffondere all'interno del materiale determinando così la formazione di una zona termicamente alterata. Il materiale inoltre viene fuso e rimosso principalmente sotto forma di goccioline di liquido che creano un deposito superficiale e quindi una lavorazione poco pulita. L'elevato spessore di materiale fuso e poi repentinamente risolidificato porta inoltre alla formazione di cricche che possono risultare devastanti per la vita dell'oggetto. Questo problema riguarda quindi tutte le sorgenti laser tradizionali (laser a CO<sub>2</sub>, laser ad eccimeri, laser Nd:YAG) che non sono quindi adatte alle microlavorazioni in quanto non caratterizzate da impulsi ultrabrevi che assicurino potenze di picco tali da "sublimare" il materiale.

I lasers Nd:YAG in regime Q-switching pompato a diodi hanno impulsi dell'ordine dei nanosecondi: ogni impulso è in assoluto poco energetico e rimuove con precisione e ripetibilità una piccola quantità di materiale. La produttività è assicurata dall'elevata cadenza degli impulsi (decine di kHz).

La lunghezza d'onda fondamentale della sorgente Nd:YAG è nel vicino IR 1064 nm, ma con l'innovativo sistema di pompaggio a diodi, molto più efficiente è stato possibile ottenere potenze e qualità ottiche del fascio adeguate anche in seconda e terza armonica rispettivamente nel visibile (532 nm) e nell'UV (355 nm). Particolarmente interessante per le finalità del progetto di ricerca si è dimostrata sin da subito la lunghezza d'onda dell'UV perché è quella che garantendo il miglior

accoppiamento tra laser e materia rende possibile realizzare porosità sul titanio del diametro di pochi microns.

I risultati delle prime prove effettuate con un laser Nd: YAG DPSS in regime di Q-switching operante in terza armonica (355 nm), su pastiglie di Ti commercialmente puro (cp) grado 4 sono stati particolarmente promettenti in quanto, come si vede dalle foto al microscopio a scansione elettronica riportate nel paragrafo dei risultati risultava evidente la possibilità tecnologica di questa tipologia di laser di realizzare porosità micrometriche controllate sia in termini di dimensione e forma che di distribuzione. Questo sembrava rendere possibile lo sviluppo di un metodo di irruvidimento controllato del titanio, nel quale dimensione, forma e distribuzione delle porosità potevano essere definite a priori ed applicate in modo preciso e riproducibile alla superficie degli impianti dentali in titanio in tempi brevi, compatibilmente con la produzione industriale.

Restavano da sviluppare i seguenti aspetti del progetto di ricerca:

Il primo di tipo tecnologico legato alla necessità di garantire l'uniformità del trattamento su una superficie geometricamente complessa come quella di un impianto dentale.

Il secondo di tipo scientifico connesso con la definizione delle dimensioni, della forma e della spaziatura in grado di promuovere e stimolare l'adesione delle cellule osteoblastiche e la loro attività osteogenica velocizzando così l'osteointegrazione. Queste informazioni erano assenti nella letteratura scientifica disponibile proprio perché fino ad allora i metodi disponibili per controllare la geometria superficiale erano molto pochi.

Doveva inoltre essere dimostrata la capacità del laser di irruvidire la superficie del titanio senza contaminarla, cosa che invece succede con le metodiche di irruvidimento convenzionali.

Analisi morfologica e caratterizzazione chimica della superficie del titanio trattata con laser DPSS-Qsw con sorgente Nd:YAG

L'analisi morfologica della superficie è stata eseguita prevalentemente utilizzando la microscopia a scansione elettronica (SEM) che fornisce immagini della superficie talmente ingrandite da consentire di apprezzare dettagli micrometrici. In tal modo è possibile valutare i risultati ottenuti mediante la lavorazione laser e nel contempo verificare il rispetto delle dimensioni e delle spaziature tra porosità realizzate. All'analisi SEM è stata abbinata l'analisi EDX con sonda chimica che consente di rivelare gli elementi dal Be.

Con microscopia a scansione elettronica è possibile ottenere una "fotografia" della superficie con risoluzioni molto elevate dell'ordine di grandezza del micron.

In questa tecnica un raggio elettronico ad elevata energia (circa 10 keV) viene fatto scorrere sulla superficie analizzata provocando l'emissione di elettroni secondari a bassa energia. Questi ultimi



vengono attratti e rivelati da uno schermo al fosforo. Nell'impatto con l'elettrone lo schermo al fosforo brilla e l'intensità della luce prodotta (che dipende dall'energia degli elettroni incidenti) viene misurata da un fotomoltiplicatore e fornisce un'immagine della superficie analizzata.

Gli stessi elettroni incidenti utilizzati per ottenere le immagini SEM provocano anche l'emissione di raggi X e quindi rendono possibile l'applicazione della tecnica EDX.

#### *ENERGY DISPERSIVE X-RAY MICROANALYSIS (EDX)*

Come precedentemente accennato, si tratta di una tecnica utilizzata generalmente in abbinamento alla microscopia a scansione elettronica.

Quando un fascio elettronico di energia compresa tra 10 e 20 keV colpisce la superficie di un materiale conduttore provoca l'emissione di raggi X da parte dello strato di materiale collocato immediatamente sotto la superficie a una profondità di circa 1-2  $\mu\text{m}$ . L'energia dei raggi X emessi dipende dalla composizione del materiale analizzato.

Proprio in considerazione della zona di materiale da cui proviene il segnale utile, EDX non può essere considerata una tecnica di superficie; viceversa, nel caso in cui la composizione sia uniforme e lo strato immediatamente al di sotto della superficie sia rappresentativo dell'intero materiale, deve essere considerata una tecnica di "bulk" (quindi relativa all'intero materiale in esame).

Facendo scorrere il raggio elettronico su tutta la superficie è possibile costruire una vera e propria mappa compositiva del campione analizzato in maniera analoga a quella in cui l'analisi al SEM fornisce invece un'immagine topografica della superficie.

Il rivelatore utilizzato nella tecnica EDX è un detector al silicio drogato che opera alla temperatura dell'azoto liquido (-196 °C). Quando un raggio X colpisce la superficie di questo detector provoca l'estrazione di un fotoelettrone quindi la migrazione di elettroni e vacanze elettroniche in direzioni opposte all'interno del detector stesso. Questa migrazione grazie al potente campo elettrico applicato agli estremi produce un impulso di corrente la cui intensità dipende dal numero di vacanze elettroniche generate e dunque, in ultima analisi, dall'energia dei raggi X incidenti. Per questo la misura della corrente registrata è correlata con l'energia dei raggi X che incidono sul detector che, come detto in principio, è funzione della composizione chimica del materiale. In questo modo la tecnica EDX può fornire una sorta di analisi elementare del materiale oggetto di studio.

L'analisi SEM-EDX quindi consente di valutare le caratteristiche morfologiche del patterning realizzato, la sua uniformità e l'assenza di contaminanti puntiformi distribuiti sulla superficie.

Per studiare invece gli effetti del trattamento laser sulla composizione chimica dello strato superficiale del titanio (5-7 nm) che, come è ormai ampiamente noto, è quello che garantisce la biocompatibilità del titanio stesso è stata utilizzata come tecnica di elezione l' XPS (X-ray

Photoelectron Spectroscopy) anche nota come ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis).

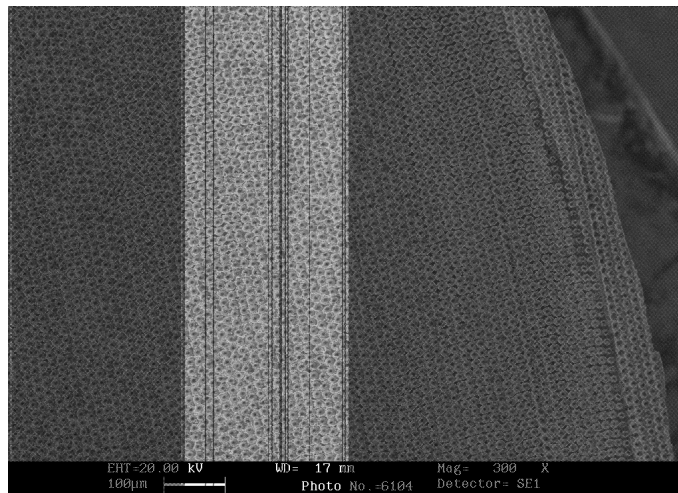
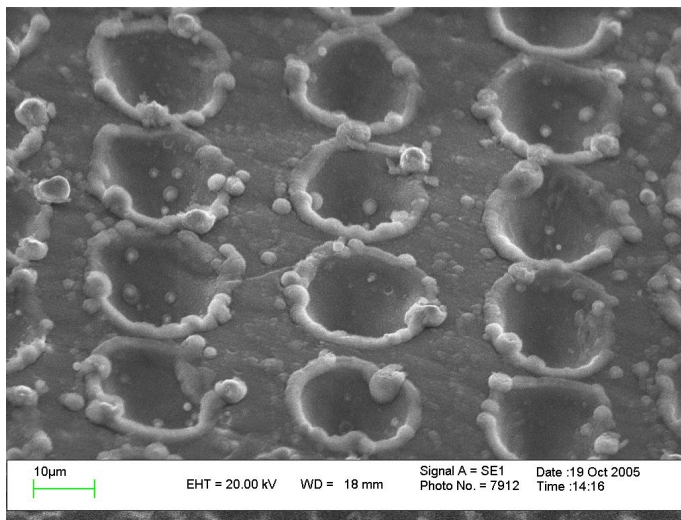
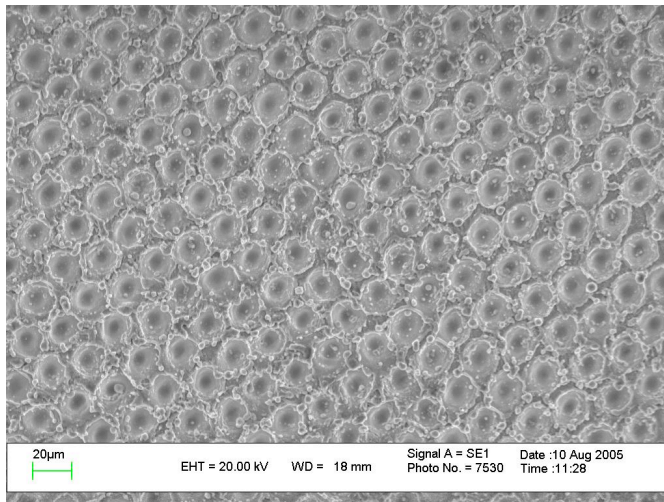
La spettroscopia XPS si basa sostanzialmente sull'effetto fotoelettrico descritto da Einstein nel 1905: i fotoni dei raggi X vengono assorbiti dagli atomi presenti nei materiali analizzati e ne provocano la ionizzazione con emissione di un elettrone da parte degli orbitali più interni. L'energia cinetica dei fotoelettroni emessi può essere accuratamente misurata mediante un appropriato analizzatore e dipende in primo luogo dall'energia dei fotoni incidenti (che secondo la relazione di Einstein è uguale al prodotto della costante di Planck  $h$  per la frequenza  $\nu$  della radiazione) e in secondo dall'energia di legame dell'elettrone espulso che a sua volta è uguale alla differenza tra il livello energetico degli atomi ionizzati e quelli allo stato fondamentale.

Dal momento che ogni elemento chimico ha ben precise energie di legame associate ad ogni orbitale atomico da cui può venir espulso un elettrone, darà origine in seguito al bombardamento con raggi X a uno spettro fotoelettronico caratterizzato da una ben precisa serie di picchi che consentirà di identificarlo in modo univoco.

Dunque la presenza di picchi a particolari valori di energia indica in modo inequivocabile la presenza di un certo elemento nel campione mentre la loro intensità è invece correlata con la concentrazione dello specifico elemento nella regione in esame. Questa tecnica, infatti, è in grado di fornire un'analisi chimica quantitativa ed è per questo che viene anche chiamata con l'acronimo ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis).

## **CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E CHIMICHE DELLE SUPERFICI IN TITANIO LAVORATE AL LASER**

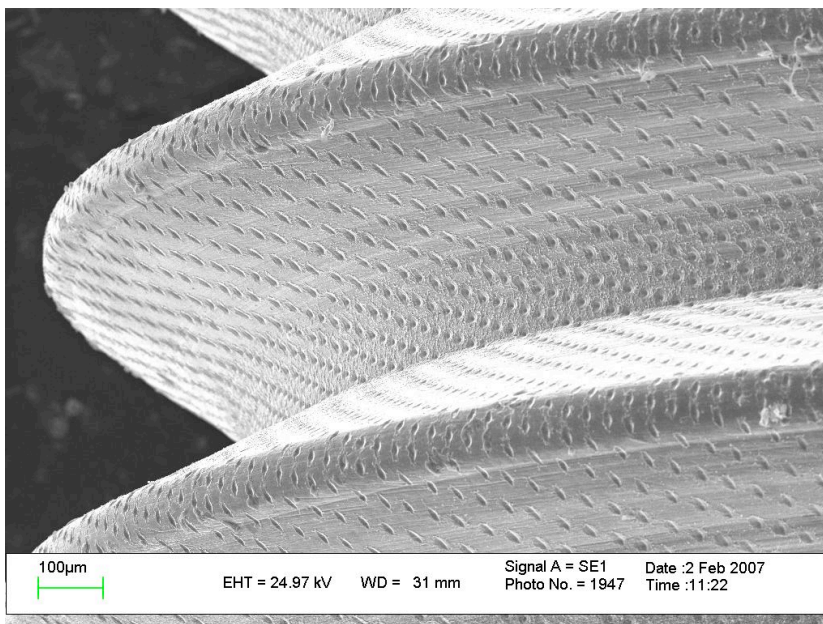
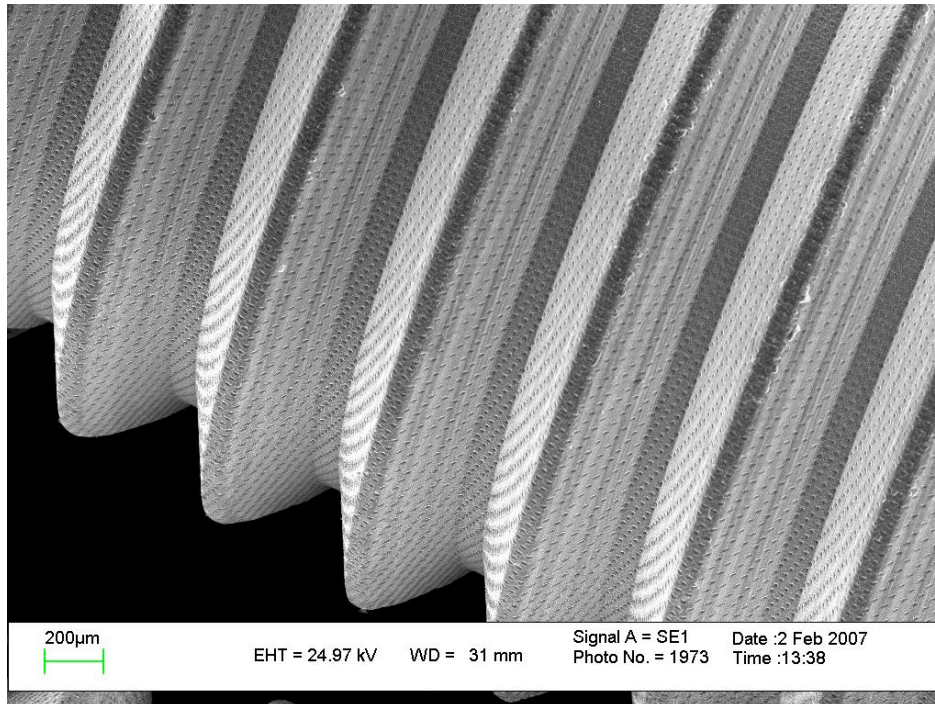
La morfologia superficiale delle superfici ottenute nello studio oggetto del presente progetto di ricerca mediante la tecnologia laser sviluppata può essere facilmente dedotta dall'osservazione delle immagini ottenute mediante microscopia a scansione elettronica riportate sotto.



Come si può facilmente vedere si tratta di superfici estremamente regolari e con caratteristiche altamente ripetibili su tutta la superficie dell'impianto o del provino. Va considerato che il diametro,

la profondità e la spaziatura dei pori sono micrometriche e possono essere variate semplicemente gestendo i parametri del laser impostati.

La riproducibilità e regolarità ottenibili con la tecnologia sviluppata nel progetto di ricerca qui descritto può essere apprezzata ancora maggiormente osservando le immagini SEM di impianti micro-irruviditi mediante laser riportate sotto.



Anche dal punto di vista della composizione chimica le superfici ottenute mediante il laser mostrano caratteristiche estremamente interessanti che le differenziano dalle altre superfici commercialmente esistenti.

Questa caratteristica può essere apprezzata osservando i dati ottenuti dall'analisi XPS dei provini trattati mediante laser che, come già detto forniscono la composizione dei 5-10 nanometri più superficiali dell'impianto che sono quelli che vengono a contatto con il tessuto osseo e che ne garantiscono la biocompatibilità.

Questi dati risultano particolarmente eclatanti se confrontati con quelli che caratterizzano altre superfici implantari presentati in articoli scientifici che si occupano appunto di analisi superficiale del titanio.

Campione	C	O	Ti	N	Al	Si	Na	Mg	Ca	Zn	Cl	F	P
*Laser	34.9	41.5	23.6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

\* dato medio 10 analisi



Table 1 Surface Composition as Detected by XPS Analysis of the 34 Implants Tested														
Implant no.	Implant surface	C	O	Ti	N	Al	Si	Na	Mg	Ca	Zn	Cl	F	P
1	m	76.5	18.2	1.4	2.1		0.6		0.2	0.6		0.3		0.1
2	m	73.2	20.6	1.6	0.6		3.0	0.2	0.2	0.2		0.1	0.1	0.2
3	m	66.5	24.6	4.7	1.0		0.8	0.2		1.8		0.3		
4	m	51.1	29.5	7.6	2.2		1.9	0.5		0.2		0.9	5.5	
5	m	54.9	30.5	8.5	2.9		0.5	0.2	1.0	0.3		0.2	0.1	
6	m	51.2	33.9	10.2	1.2		1.2	0.1	0.8	0.3		1.0		
7	m	46.7	37.1	11.4	0.7		1.9	0.4		1.5	0.2	0.1		
8	m	41.9	39.4	12.3	1.7		2.1		0.2	0.2		0.3	1.6	0.3
9	m	35.5	40.8	12.7	1.8		7.0		0.9	0.5	0.2	0.5		
10	m	33.8	46.2	13.1	3.2		0.7		0.6	0.1		0.3		2.0
11	m	39.5	42.9	13.9	1.3		1.5					0.1	0.7	
12	s	47.2	31.6	3.3	1.3	14.7	1.4			0.4				
13	s	17.9	51.7	18.3	0.7	6.3	2.4			0.5			2.0	
14	s	25.7	46.5	4.6	0.6	17.5	2.9	0.6	0.6	0.8	0.2			
15	s	40.6	39.3	6.5	4.7	0.9	0.8	1.5	1.5	1.3	0.2	0.9		1.8
16	s	40.9	38.2	7.0	0.7	4.4	1.6	0.8	2.5	2.5	0.5	0.2		0.5
17	s	46.9	34.0	9.3	0.7		3.3	0.6	2.4	1.8	0.5			0.5
18	s	43.6	36.2	11.9	0.8	3.1	0.1	0.3	2.1	1.1		0.1	0.5	
19	s	35.4	44.4	14.4	1.6		0.9	0.6		0.6	0.2	0.9		1.0
20	s	20.5	51.6	14.8	1.3	9.4	1.2	0.9				0.2		
21	s	33.9	46.8	14.9	1.1		0.7	1.3	0.3	0.1		0.1	0.8	
22	a	47.0	33.5	9.4	3.5	2.4	1.2		0.8	0.7		0.6	0.8	
23	a	42.9	38.2	12.5	2.8		1.4			0.8		0.6	0.7	
24	a	26.9	48.2	15.7	1.9		2.9	1.4		0.2			1.9	1.0
25	a	36.2	43.5	15.8	1.0		2.5	0.2		0.1		0.2	0.3	
26	a	40.9	39.3	16.5	0.1		2.0			0.5				
27	a	23.5	48.9	16.5	3.8		1.8	2.9	0.3	0.3		0.3	0.9	
28	a	23.2	43.9	17.0	2.2		1.6	2.9	0.5			0.3	8.4	
29	p	49.4	32.1	11.7	5.0		0.3			0.9				0.6
30	p	33.4	42.9	15.8	4.1		1.0	0.2	0.7	0.9		0.7		
31	p	31.2	46.8	16.8	3.9		0.4			0.3		0.3		
32	p	33.5	43.5	17.1	2.3		1.8	0.9	0.9	0.1				
33	p	33.4	45.3	17.4	2.0		0.8	0.5		0.4		0.1		
34	p	29.4	48.4	18.1	2.2		0.5			0.1		0.2	0.6	0.3

m = machined; s = sandblasted; a = acid etched; p = plasma sprayed.

L'importanza dei risultati ottenuti può essere apprezzata in particolare tenendo conto dei seguenti aspetti:

- La composizione elementare dello strato superficiale del titanio che, come noto, è costituito da ossido di titanio (TiO<sub>2</sub>) dovrebbe essere in condizioni ideali 66% O e 33 % Ti.
- L'ossido di titanio, anche se la superficie è stata pulita perfettamente dai residui derivanti dal ciclo di lavorazione meccanica, quando esposto a un'atmosfera normale adsorbe molecole organiche normalmente presenti in fase vapore (idrocarburi, alcoli, acidi carbossilici). Questo fa sì che nell'analisi elementare dello strato superficiale assistiamo a un aumento della percentuale di C a discapito della percentuale di Ti e O.

Dalla letteratura scientifica si deduce che quando una percentuale di carbonio non superiore al 35% è indice di un buon grado di pulizia da contaminanti organici.

- Ogni ulteriore contaminante presente sulla superficie derivante dalla lavorazione degli impianti in titanio o dal trattamento di superficie abbatta ulteriormente la percentuale del titanio nella composizione dello strato superficiale al punto che come si vede dalla tabella tratta da una pubblicazione una percentuale compresa tra il 14 e il 18 % è il massimo a cui si possa aspirare con i più diffusi trattamenti superficiali.

Tutti queste considerazioni evidenziano l'eccezionalità della composizione superficiale degli impianti trattati laser: oltre all'assenza di contaminanti che a diversi livelli sono presenti su tutte le altre superfici commerciali è eccezionalmente elevata la percentuale di Ti che raggiunge quasi il 24 % come dato medio.

Questo aspetto è molto interessante, non solo da un punto di vista scientifico ma anche dal punto di vista tecnologico.

La quasi totalità dei trattamenti di irruvidimento superficiale richiede di essere seguita da complicate operazioni di pulizia che devono essere documentate da risultati analitici e validate per garantire la costanza e la riproducibilità del risultato. Dai dati riportati sopra risulta invece evidente che il trattamento laser migliora lo stato di pulizia della superficie in titanio rendendo possibile il confezionamento immediatamente dopo il trattamento di superficie senza ulteriori operazioni. Esistono inoltre pubblicazioni scientifiche che evidenziano l'azione sterilizzante dei laser Nd:YAG impulsati. E quindi ragionevole supporre che il trattamento laser possa essere interessante anche per la sua capacità di abbattere notevolmente il carico microbiologico (bioburden) presente sugli impianti. Ulteriori indagini verranno condotte nel prosieguo dell'attività di ricerca.

## **OSTEOINTEGRAZIONE**

L'osteointegrazione è stata originariamente definita come il “contatto diretto strutturale e funzionale tra l'osso vitale ed un impianto caricato”. Nella pratica clinica questo si traduce con l'assenza di qualsiasi movimento progressivo dell'impianto all'interno del contesto osseo. Conseguentemente consiste nello stretto ancoraggio di un materiale non vitale (titanio) ad un mezzo vitale (l'osso) che perdura in condizioni di carico fisiologico dell'impianto.

Nel campo della chirurgia orale l'osteointegrazione ha trovato grande applicazione nella riabilitazione dentaria attraverso protesi fisse sostenute da impianti o rimovibili ritenute dagli stessi.

Il titanio puro, esposto alle condizioni atmosferiche, viene ricoperto spontaneamente da un sottile strato ossidato. Quando invece viene inserito all'interno di tessuti biologici, le cellule infiammatorie (in modo particolare i macrofagi) contribuiscono alla formazione dello strato ossidato attraverso l'escrezione di enzimi proteolitici, citochine, superossido e perossido d'idrogeno.

La capacità di formare di questo strato ossidato è unica del titanio, mentre per gli altri metalli presentano uno strato esterno con solubilità troppo bassa e, conseguentemente, bassa stabilità del complesso.

Il processo che intercorre tra l'atto chirurgico d'inserimento della fixture implantare e la totale integrazione dello stesso è costituito da una serie di meccanismi precisi in cui le cellule hanno il ruolo di protagonisti assoluti.

Tutte le cellule comunicano tra loro attraverso un fine meccanismo di regolazione intercellulare, basato su molecole segnale e recettori specifici di membrana ovvero su canali di membrana comunicanti.

I messaggeri più importanti sono senza dubbio citochine ed ormoni. Le prime sono proteine appartenenti ai gruppi delle interleuchine (IL), dei fattori di crescita e dei fattori di differenziazione.

Gli ormoni, invece, possono essere distinti in ormoni peptidici, ormoni lipidi ed ormoni amminici.

Altri messaggeri possono essere piccole molecole come l'ossido nitrico o ioni.



Differenti tipi cellulari corrispondono a diverse fasi cronologiche di guarigione della ferita prodotta dall'impianto, processo che non si distanzia in modo grossolano dalle guarigioni di tutti gli altri tessuti umani, ed in particolare dalla guarigione ossea:

- fase di emostasi (minuti-ore);
- fase proinfiammatoria (ore-giorni);
- fase proliferativa (giorni-settimane);
- fase di rimodellamento (dalla 3a settimana in poi).

## **Emostasi**

L'emostasi, o fase *essudativa*, ha inizio con il trauma chirurgico esercitato dalla fresa nel momento in cui quest'ultima viene inserita all'interno dell'osso.

Il trauma chirurgico provocato dalla fresa sull'osso e la rottura dei piccoli vasi endoossei stimola il rilascio e la produzione dei suddetti fattori e la polimerizzazione del fibrinogeno iniziata dalle piastrine e dalla cascata ematica ed effettuata dalla trombina.

A seguito del posizionamento della fixture, la superficie dell'impianto interagisce con acqua e ioni e questo cambia la carica della stessa, rendendola disponibile al legame elettrostatico con ioni positivi bivalenti come il calcio.

Gli ioni calcio sono poi seguiti da proteine del plasma come albumina, globuline o fibrina. L'albumina si lega per prima alla superficie a causa della sua alta concentrazione ematica, ma viene presto sostituita da proteine con minor concentrazione, ma maggiore affinità per la superficie come vitronectina e fibronectina.

Grazie all'adsorbimento delle proteine, le cellule divengono in grado di aderire alla superficie in titanio (ad esempio grazie alle integrine di membrana in grado di legarsi alle sequenze RGD della fibronectina).

Nei siti di lesione vascolare, le piastrine si aggregano formando trombi in grado di chiudere i difetti. Vengono così prodotte molecole come la trombina, l'adenosina difosfato, il collagene, il fibrinogeno e la trombospondina. La vitronectina adesa al titanio è in grado di legare le piastrine, attivandole e attivando l'integrina. Quest'ultima, come detto in precedenza, lega il fibrinogeno e crea un network piatrinico più ampio.

Le piastrine sono quindi in grado di legare il collagene con specifici recettori glicoproteici e l'adesione è ulteriormente rinforzata dal fattore Von Willebrand, che forma legami addizionali.

Oltre a queste, molecole come la serotonina inducono la vasocostrizione, in modo da diminuire il flusso ematico locale.

Il rilascio delle citochine da parte delle piastrine legate ed attivate dà inizio alla fase infiammatoria.

## **Infiammazione**

La fase infiammatoria ha inizio pochi minuti dopo l'atto chirurgico e procede per i giorni seguenti. Le piastrine rilasciano fattori quali il *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), il *platelet-derived growth factor* (PDGF) e il *basic fibroblast growth factor* (bFGF). La bradichinina aumenta la permeabilità vascolare per i fluidi, le proteine sieriche ed i leucociti. L'istamina induce un effetto vasodilatatorio ed induce iperemia. L'iniziale vasocostrizione prodotta durante la fase emostatica viene gradualmente sostituita da vasodilatazione.

Il sistema immunitario innato, composto da elementi molecolari (complemento) ed elementi cellulari (granulociti neutrofili -PMN- e macrofagi), viene attivato da molecole batteriche non specifiche.

Il complemento è un gruppo di glicoproteine in grado di formare canali di membrana (perforine) che distruggono le cellule batteriche o di legare i batteri facilitando la fagocitosi.

I granulociti neutrofili invadono invece il coagulo attraverso la diapedesi dai vasi sanguigni: dapprima vi è un'adesione reversibile dei leucociti con la parete interna del vaso, mediata da selectine, che in seguito si trasforma in un legame irreversibile, mediato dalle molecole ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), ICAM-2 e VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). I leucociti così legati all'endotelio vasale, fuoriescono da piccoli gap nella mucosa, producendo elastasi e collagenasi per facilitare la loro fuoriuscita dalla lamina basale. Una volta all'esterno del vaso, vengono attratti per gradiente chimico (chemiotassi).

Sostanze chemiotattiche per i granulociti neutrofili sono i prodotti della fibrinolisi, fibrinopeptidi risultanti dall'attivazione della fibrina attraverso la trombina, fattori del complemento, leucotriene B<sub>4</sub> prodotto dai granulociti presenti, proteine batteriche, fattore attivatore delle piastrine (PAF), *tumor necrosis factor alpha*, PDGF e IL-8. Alcuni di questi fattori sono prodotti dai granulociti stessi o dai macrofagi e servono al reclutamento di cellule immunitarie in caso di elevata densità di cellule batteriche.

I PMN sono in grado di uccidere i batteri attraverso radicali reattivi dell'ossigeno e dell'idrogeno ed ipocloriti, tossici anche per le cellule e le strutture sane circostanti.

Inoltre gli stessi sono in grado di produrre enzimi digestivi quali elastasi e collagenasi, in grado di aumentare il grado di danno tissutale ai tessuti vicini.

Se la quantità di batteri presenti nella ferita è alta e la risposta immunitaria innata è prolungata, può venirsi a creare un ambiente tossico, nel quale il network fibrino può dissolversi. Molecole protettive come proteoglicani e glicoproteine della matrice extracellulare si trovano in basse concentrazioni e non riescono a proteggere i fattori di crescita dall'azione digestiva degli enzimi proteolitici. Se il numero di batteri o la virulenza degli stessi aumenta, i tessuti si liquefanno e si viene a formare pus.

Per evitare queste problematiche, è necessario lavorare con la minor contaminazione batterica possibile all'interno della ferita, utilizzando presidi meccanici e farmacologici. Una bassa conta batterica permette il rapido passaggio dalla fase infiammatoria alla fase proliferativa.

In caso di eliminazione dei batteri, dopo aver rimosso anche i detriti tissutali, i macrofagi producono fattori angiogenici e fibrogenici. Si registrano alti livelli di ossido nitrico (NO) e di prostaglandine, necessarie per l'attivazione fibroblastica. I fibroblasti sono in grado di produrre molecole inibitorie delle metalloproteinasi, che bloccano l'azione digestiva dei granulociti agendo come i proteoglicani in difesa dei fattori di crescita.

Un'alta concentrazione di fibronectina permette l'adesione dei fibroblasti attraverso i siti di legame dell'integrina. La ferita viene così popolata da fibroblasti ed ha inizio la fase proliferativa.

### **Proliferazione**

Il segno del passaggio dalla fase dell'emostasi a quella di proliferazione è la formazione di nuovi vasi sanguigni e di nuova matrice extracellulare, ossia nuovo tessuto detto *tessuto di granulazione*.

La durata di questa fase da qualche giorno a qualche settimana.

Stimolati dal FGF prodotto dai macrofagi, i fibroblasti migrano all'interno del coagulo ematico scavando tunnel all'interno della matrice extracellulare di fibrina grazie alla produzione di metalloproteinasi della matrice (MMPs). Le MMPs degradano la fibrina ed espongono le integrine ed i loro siti di legame; i fibroblasti sono così in grado di legare attraverso le integrine i peptidi RGD della fibronectina e di approfondirsi all'interno della ferita.

In sostituzione del coagulo degradato i fibroblasti depongono fibronectina cellulare insolubile, collagene, vitronectina, decorina e altri proteoglicani. La direzione del movimento dei fibroblasti è guidata dal gradiente di concentrazione dei fattori di crescita prodotti dai macrofagi.

L'angiogenesi è stimolata dall'anossia: questa attrae i macrofagi, che sono in grado di vivere in condizioni di anaerobiosi. In queste condizioni i macrofagi rilasciano il *vascular endothelial growth factor* (VEGF), il quale è in grado di stimolare la produzione di precursori di cellule endoteliali ed è chemiotattico per queste cellule. Il VEGF attrae i periciti, cellule progenitrici delle cellule

endoteliali, che si organizzano e proliferano in modo da formare delle strutture tubulari. Il volume necessario alla formazione dei suddetti “tubi” è ricavato grazie alle MMPs. Una volta maturi, i tubi vengono connessi ad un vaso preesistente ed il sangue inizia a circolarvi.

Anche i fattori PDGF e FGF agiscono come induttori di angiogenesi.

L'angiogenesi è condizione necessaria alla osteogenesi: l'osso immaturo, infatti, si forma solo in prossimità dei vasi sanguigni, ad una distanza non superiore a 200  $\mu\text{m}$ . Un altro prerequisito fondamentale per la formazione di nuovo osso è la presenza di un ambiente meccanicamente stabile.

Alcune cellule staminali mesenchimali vengono destinate al differenziamento osseo dalle BMPs (*bone matrix proteins*), che si trovano in alta concentrazione all'interno di una ferita ossea dopo 3 giorni. Le cellule osteoprogenitrici aderiscono al titanio attraverso le integrine: i precursori delle cellule ossee infatti producono una fibronectina cellulare in grado di aderire alle proteine adese al titanio. Dopo l'adesione la cellula viene denominata *osteoblasto* ed inizia a produrre osteocalcina e fosfatasi alcalina.

A seguito dell'inserimento della fixture implantare, l'impianto trova la sua stabilità primaria grazie al contatto diretto con l'osso e alla frizione esercitata durante l'inserimento passivo. Stabilità primaria corretta significa che la stabilità dovuta all'attrito dell'impianto è più alta del picco dinamico più alto di forza di carico. Qualora qualche picco fosse più alto della forza di attrito, possono verificarsi micromovimenti della fixture che causano perdita della stabilità primaria.

Durante le prime settimane, la stabilità primaria tende a decrescere, mentre la neoformazione ossea garantisce la formazione della stabilità secondaria.

Durante la prima settimana si ha la formazione di osso immaturo, *woven bone*, caratterizzato da alta concentrazione di fibre collagene orientate in modo casuale. Questo cresce lungo le superfici di osso preesistente e tra le spire dell'impianto e tende ad incorporare i detriti ossei prodotti dalle frese di preparazione del sito implantare.

Quindi si assiste alla produzione di matrice collagenica di tipo III da parte degli osteoblasti, che in seguito viene rimodellata in collagene di tipo I che va incontro a mineralizzazione grazie alla deposizione di idrossiapatite (processo di ossificazione *intramembranoso*).

In seguito, durante la fase di rimodellamento, l'osso immaturo, relativamente disorganizzato, viene parzialmente sostituito e rimodellato da parte degli osteoclasti e degli osteoblasti rispettivamente, che rimuovono *woven bone* per deporre osso lamellare.

## **Rimodellamento**

La cellula principe in questa fase cruciale è l'osteoclasto: questi appaiono qualche giorno dopo l'atto chirurgico ed iniziano a creare volumi per la neoformazione di osso, rimuovendo anche i contatti primari che vi erano stati tra osso ed impianto.

Questa fase può durare anche alcuni anni fino a quando tutto lo *woven bone* non è stato sostituito da osso maturo, od osso lamellare. In quest'ultimo il collagene si presenta distribuito parallelamente e diversamente dall'osso immaturo che si sviluppa parallelo al titanio all'interno dei solchi tra le spire, l'osso lamellare tende a formarsi primariamente a livello delle estremità delle spire in modo da distribuire meglio le forze occlusali all'osso basale.

L'architettura che viene a formarsi risponde ai principi della leggerezza e della robustezza, in modo da avere il minor numero di trabecole che possano supportare la gravità dei pesi occlusali.

Il sistema di riassorbimento e neoapposizione ossea è governato da due molecole competitors per stesso recettore prodotte dagli osteoblasti: il *receptor activator of nuclear k-factor-ligand* (RANKL) e l'osteoprotegerina. Entrambe questi attivatori competono per il RANK (receptor activator of nuclear k-factor), il quale è in grado di attivare l'osteoclastogenesi in caso di legame con RANKL o di inibire l'osteoclastogenesi, favorendo la deposizione di osso, in caso di legame con l'osteoprotegerina.

Altre molecole sono in grado di modulare l'attività osteoblastica, quali l'IL-11, la prostaglandina E2, l'ormone paratiroideo, la vitamina D e l'estradiolo. L'ormone paratiroideo, ad esempio, inibisce la secrezione di osteoprotegerina dagli osteoblasti e conseguentemente aumenta l'osteoclastogenesi, favorendo la degradazione dell'osso.

Tra gli osteoclasti e l'osso si viene a creare un volume isolato in grado di proteggere le cellule ed i tessuti circostanti dagli acidi e dagli enzimi aggressivi rilasciati per favorire il riassorbimento osseo; questo spazio è denominato *lacuna di riassorbimento*. Il segno visibile dell'attività osteoclastica è la modifica della conformazione della membrana cellulare, che tende a formare numerose pieghe in modo da aumentare la superficie, dando origine al cosiddetto *bordo increspato*. All'interno di ogni piega sono presenti pompe ioniche in grado di espellere nella matrice extracellulare acido cloridrico che demineralizza l'osso esponendo il collagene, a sua volta degradato da speciali enzimi, quale la catepsina K.

Tuttavia, il processo che regola con precisione il bilancio tra l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti è tuttora ricco di incertezze.

La neoapposizione di osso è regolata attraverso il sistema Haversiano: gli osteoclasti si organizzano all'estremità di un gomito di capillari e scavano un tunnel all'interno della matrice extracellulare del "vecchio" osso. Attorno a questo tubo vengono depositi strati concentrici di nuove lamelle ossee, in modo tale da creare un'unità formata da un vaso centrale e lamelle ossee concentriche alla periferia, detta *osteone*.

Il nuovo osso è costruito in modo da essere orientato a seconda del carico. Questo processo è regolato dagli osteociti, cellule sepolte all'interno dell'osso in grado di percepire i carichi grazie ai loro lunghi processi citoplasmatici che arrivano fino in superficie. La teoria dei fluidi prevede che qualsiasi carico causi uno spostamento di fluidi all'interno dei canali percorsi dai processi citoplasmatici degli osteociti, e tali spostamenti vengono tradotti dalle ciglia degli osteociti in segnali intracellulari che si propagano tra gli osteociti in un network denominato sincizio osteocitico.

Da qui viene prodotta una segnalazione extracellulare mediata da citochine volta a modificare il bilancio osteoblasti-osteoclasti.

## **Conclusioni**

Il processo di osteointegrazione non differisce in modo sostanziale da qualsiasi altro processo di guarigione che può avvenire in ogni distretto corporeo ed, in particolare, nel tessuto osseo.

Gli attori sono sempre le cellule, che si comportano in modo da permettere la guarigione del sito traumatizzato, mentre dall'altra parte la totale biocompatibilità del titanio fa sì che questo non venga espulso dall'organismo, ma integrato in esso.

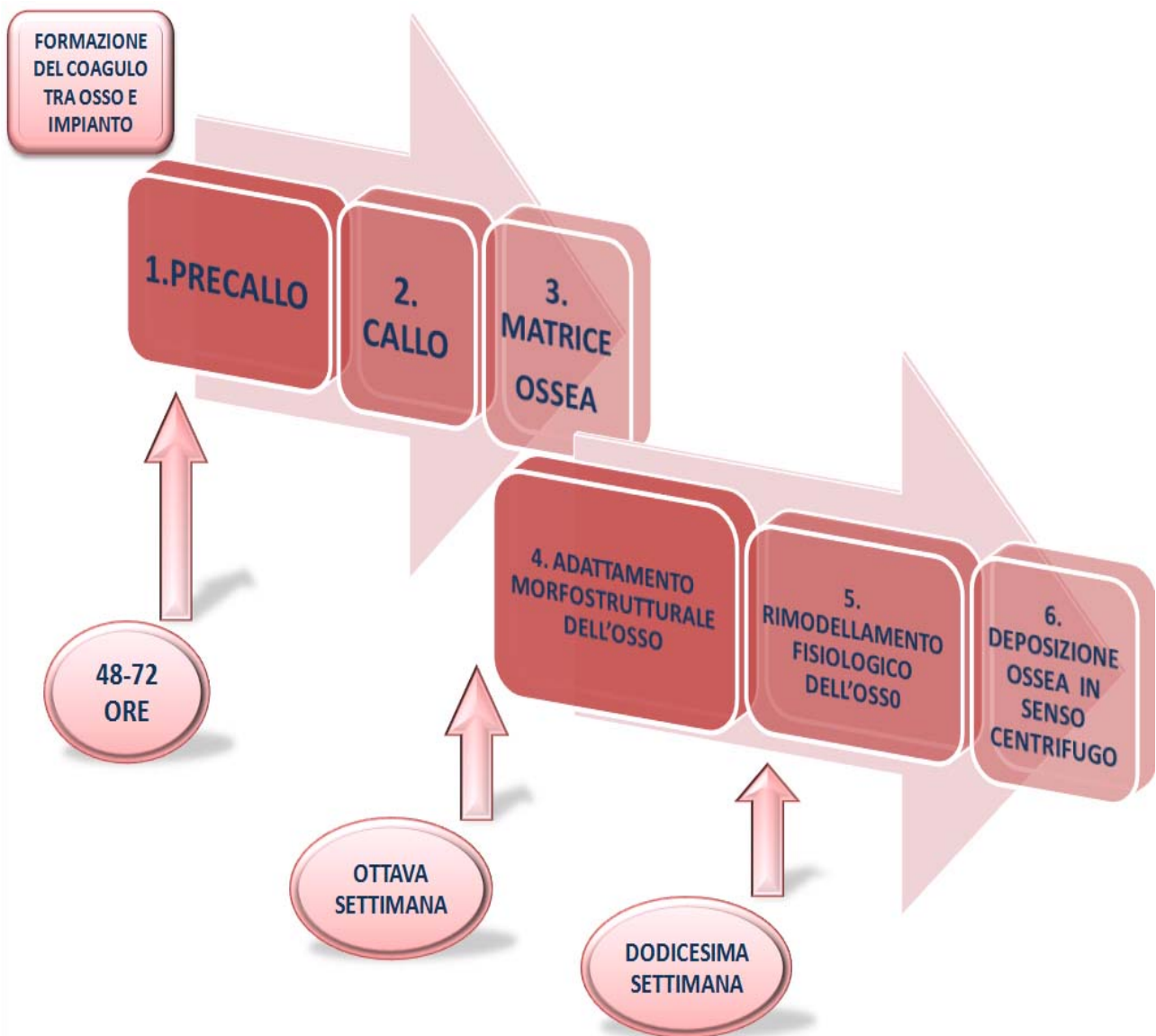
L'organismo provvede da prima a "pulire" il sito traumatizzato da qualsiasi forma di contaminazione, in modo tale da creare un ambiente sterile, favorevole alla ripopolazione cellulare ed alla ricrescita tissutale.

Solo comprendendo correttamente questi principi biologici alla base dell'osteointegrazione riusciamo a capire esattamente il significato delle nostre attività cliniche.

## **CELLULE STAMINALI**

Le cellule staminali certamente più note nell'accezione comune del termine sono le cosiddette cellule staminali embrionali. Cellule primordiali, esse derivano dall'embrione, e più precisamente dalla massa cellulare interna del blastociste.

**Fig. 1** Cellule staminali embrionali. Fonte: Lanza



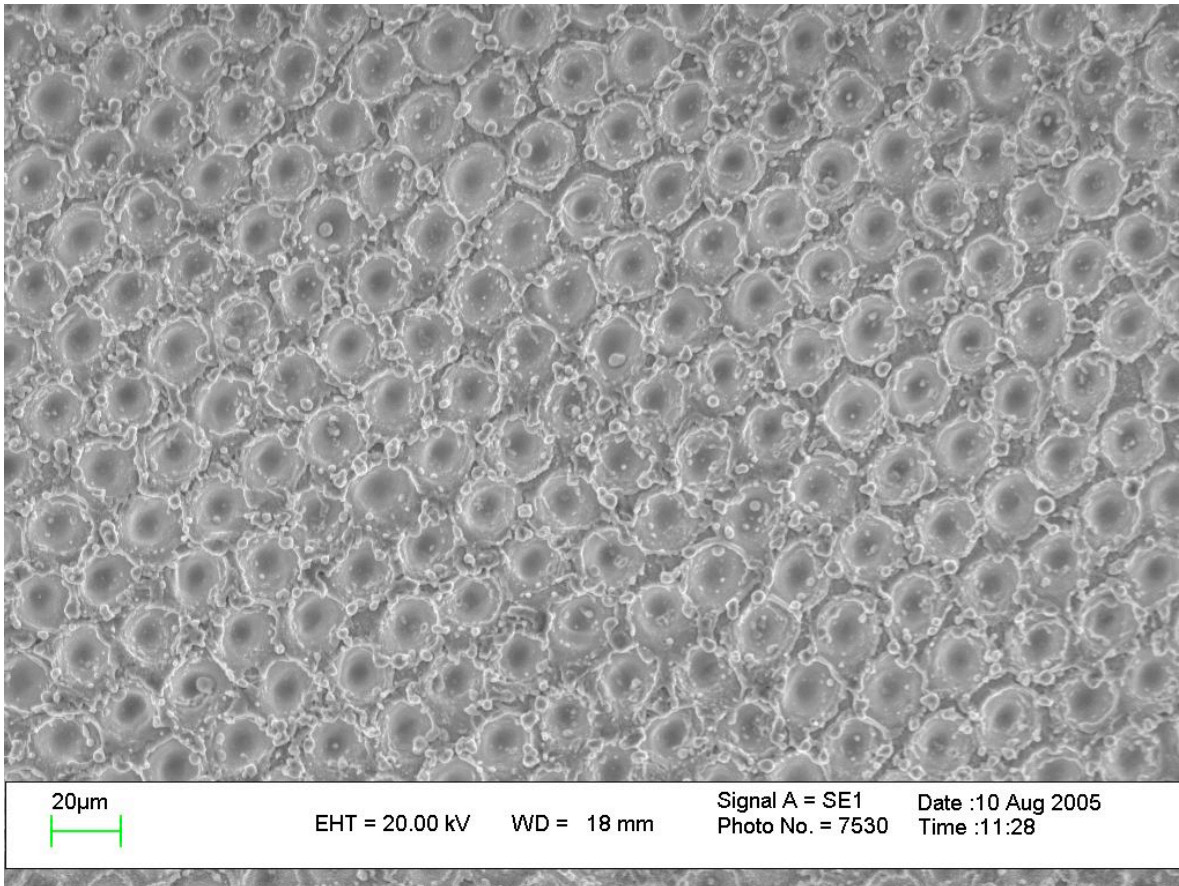
Isolate per la prima volta più di 20 anni fa (Martin, 1981), queste cellule possiedono due caratteristiche importanti che le rendono estremamente interessanti: straordinaria capacità di autorinnovamento e totipotenza. Per autorinnovamento si intende potenzialità proliferativa, ed è stato dimostrato come queste cellule possiedano una capacità di proliferazione e replicazione “in vitro” virtualmente infinita. Esse possono perpetuarsi in coltura per oltre due anni, senza manifestare attenuazione della capacità proliferativa o segni di senescenza, e senza perdere il proprio stato altamente indifferenziato. Per totipotenza invece si intende la capacità di queste cellule altamente indifferenziate di dare origine sostanzialmente a qualsiasi linea cellulare, di derivazione dai tre foglietti embrionali ovvero mesoderma, ectoderma ed endoderma. Questa caratteristica è molto importante ed è mantenuta inalterata anche dopo innumerevoli cicli replicativi. Oggi sappiamo come cellule staminali embrionali possano differenziarsi in osteoblasti,



in grado di deporre osso, semplicemente arricchendo il mezzo di coltura con dexametasone, acido ascorbico e beta glicerol fosfato, BMP-2 e vitamina D3. L'enorme potenziale replicativo e la notevole capacità differenziativa delle cellule staminali embrionali fa certamente pensare ad un futuro impiego nell'ambito della medicina rigenerativa. Tuttavia l'utilizzo di queste cellule è oggi proibito in molti paesi ed è al centro di un aspro dibattito etico e legale che ne rende assolutamente improponibile l'utilizzo in odontostomatologia. Inoltre, l'eccessiva capacità proliferativa di queste cellule è causa dell'insorgenza di teratomi e teratocarcinomi, come dimostrato da numerosi studi pre-clinici (Trounson, 2002). Infine, l'induzione di risposta immunitaria con l'impiego di cellule staminali embrionali è ben documentata, benchè studi recenti abbiano dimostrato come la soppressione di alcuni geni del complesso maggiore di istocompatibilità possa risolvere, almeno in modelli animali, questo problema. La recente scoperta di cellule anch'esse altamente indifferenziate, le cellule staminali del cordone ombelicale, ha suscitato notevole interesse. Tuttavia, benchè queste cellule siano in grado di proliferare estensivamente, differenziarsi in osteoblasti, adipociti, condroblasti, cellule emopoietiche e cellule neurali, e non presentino per il loro impiego alcuna implicazione etica o legale, non è ancora del tutto chiaro se possano indurre carcinogenesi o generare risposta immunitaria una volta impiantate nell'ospite.

Ad oggi, le cellule staminali adulte rappresentano l'opzione terapeutica più valida in chirurgia ossea rigenerativa stomatologica e più in generale in tutte le chirurgie rigenerative. Si tratta di cellule staminali indifferenziate, che risiedono però nei tessuti maturi dell'adulto, lungo tutto l'arco dell'esistenza. La scoperta nello stroma midollare dell'adulto di un ristretto numero di cellule altamente indifferenziate, in grado di dare origine ad osteoblasti, adipociti e condroblasti, è merito di Friedenstein. (Friedenstein et al, 1970, Friedenstein et al, 1976). Esse sono state denominate cellule mesenchimali indifferenziate (MSCs). Pur essendo una delle più ricorrenti in letteratura, questa ultima definizione è tuttavia controversa, dal momento che un tessuto mesenchimale inteso mesenchima embrionale non esiste nell'adulto. Per tale ragione molti autori preferiscono non parlare di cellule mesenchimali indifferenziate, e piuttosto sottolineano come nei tessuti adulti connettivali adulti esistano dei precursori, o cellule progenitrici, in grado di differenziarsi sotto opportuni stimoli e rigenerare al bisogno i tessuti danneggiati. Al di là di questa disputa puramente terminologica, è evidente come l'impiego di queste cellule possa costituire un argomento di grande interesse nell'ambito della chirurgia ossea rigenerativa. Esse infatti sono reperite nei tessuti maturi dell'adulto, attraverso metodiche prive di qualsivoglia implicazione di tipo etico-legale, e possiedono caratteri simili alle cellule staminali embrionali, pur con alcune significative differenze.

**Fig. 2** Cellule staminali adulte nei tessuti di derivazione mesenchimale



Anch'esse sono dotate infatti di forte potenziale replicativo; tuttavia la loro capacità proliferativa in coltura appare essere estesa ma non infinita, e certamente inferiore a quella dimostrata dalle cellule di derivazione embrionale. Infatti la gran parte delle cellule staminali adulte deve sottostare in vitro al limite di Hayflick, mostrando segni di senescenza dopo un numero eccessivo di cicli replicativi in coltura, insieme ad una graduale perdita di potenziale differenziativo. In secondo luogo le cellule staminali adulte appaiono possedere caratteri di multipotenza piuttosto che di totipotenza. Per multipotenza si intende la capacità di differenziarsi in 2 o 3 linee cellulari e non altre, con la tendenza marcata a dare origine a cellule del tessuto dal quale provengono. Esiste cioè un "indirizzo preferenziale" (default pattern) di differenziazione, che sembra essere appunto determinato dal tessuto di provenienza. Questo non rappresenta affatto un problema, dal momento che si vuole ottenere la rigenerazione ossea e la sola differenziazione delle cellule staminali in osteoblasti attivi. In verità l'individuazione di numerose sottopopolazioni con differenti caratteristiche all'interno delle cellule staminali adulte potrebbe far pensare a una sorta di organizzazione gerarchica, in cui la punta della piramide dovrebbe essere rappresentata da un gruppo ristretto di cellule altissimamente indifferenziate e con capacità replicative non dissimili da quelle di origine embrionale.

	<b>Cellule Staminali Embrionali</b>	<b>Cellule Staminali del Cordon Ombelicale</b>	<b>Cellule Staminali Adulte</b>
<b>Stato</b>	<i>Primordiali</i>	<i>Alta mente Indifferenziate</i>	<i>Alta mente Indifferenziate</i>
<b>Capacità Proliferativa</b>	<i>Elevatissima</i>	<i>Elevata</i>	<i>Elevata ma virtualmente soggetta a un limite</i>
<b>Capacità Differenziativa</b>	<i>Totipotenti</i>	<i>Multipotenti</i>	<i>Multipotenti</i>
<b>Problemi Etico-Legali</b>	<i>Notevoli</i>	<i>Assenti</i>	<i>Assenti</i>
<b>Rischio Carcinogenesi</b>	<i>Concreto</i>	<i>Possibile</i>	<i>Assente</i>
<b>Rischio Immunitaria</b>	<i>Concreto</i>	<i>Possibile</i>	<i>Assente</i>

**Tab.1** Tipologie di cellule staminali: aspetti comuni e principali differenze.

### **Prelievo**

Di grande rilievo è l'individuazione del tessuto dal quale prelevare le cellule staminali adulte. Il prelievo rappresenta infatti il primo passo nella preparazione di queste cellule all'utilizzo in contesti clinici. Esse infatti si trovano in una svariata quantità di tessuti quali periostio, membrana sinoviale, muscolo, derma, sangue, midollo osseo, osso trabecolare, tessuto adiposo e tra i periciti. E' intuitivo come i siti di prelievo ideale possano essere rappresentati, in ambito odontostomatologico, da midollo osseo, osso trabecolare, periostio e, in caso di pazienti che si sottopongano eventualmente a liposuzione, dal tessuto adiposo. Ulteriori fonti possono essere infine garantite dalla polpa dentale, dal legamento parodontale e dai denti decidui.

### **SEDI DI PRELIVO**

Midollo Osseo

Osso Trabecolare

Periostio

Tessuto Adiposo

Polpa Dentale

Legamento Parodontale

Denti Decidui

**Tab. 2** Possibili sedi di prelievo di cellule staminali adulte in ambito odontostomatologico

Il prelievo deve essere in grado di garantire un'adeguata quantità di cellule indifferenziate in partenza, da sottoporre a cicli replicativi in coltura. Le cellule staminali adulte, come abbiamo anticipato, possono perdere parte del proprio potenziale replicativo se sottoposte ad un numero eccessivo di cicli di espansione in coltura e, non ultimo, perdono capacità differenziativa. L'aspirato midollare, dallo sterno o dalla cresta iliaca, rappresenta certamente una procedura invasiva, ma sembra garantire un numero di cellule indifferenziate superiore al prelievo bioptico dal tessuto trabecolare o da periostio. In ogni caso la quantità di cellule staminali adulte presenti nel tessuto stromale del midollo osseo è piuttosto bassa e rappresenta una piccola frazione (0,001-0,01%) della popolazione totale delle cellule nucleate presenti nel midollo. In termini meramente quantitativi la liposuzione è naturalmente in grado di offrire un numero molto maggiore di cellule staminali di partenza. Questa procedura non rappresenta in ogni caso la via di maggior prospettiva in ambito odontostomatologico, ove il prelievo di piccole quantità di osso trabecolare o di tessuto periostale è preferibile e maggiormente praticabile. E' importante ricordare come il numero di cellule staminali adulte presenti nei tessuti sia in qualche modo correlato all'età del paziente: infatti un paziente anziano sottoposto a radiochemioterapia può avere un notevole danneggiamento e rimaneggiamento del tessuto stromale midollare, con conseguente drastica riduzione di numero delle cellule staminali adulte.

### **Isolamento**

Una volta individuata l'opportuna sede di prelievo, il passo successivo consiste nell'isolare le cellule staminali adulte da tutte le altre, tramite centrifugazione per gradiente di densità. Le cellule così ottenute sono identificate ed isolate per la loro capacità di aderire su coltura di polistirene, di assumere una morfologia fibroblastica e di proliferare formando colonie, definite CFU "colony forming units". Le cellule non aderenti, in gran parte cellule emopoietiche, vengono progressivamente scartate nei frequenti cambi del mezzo di coltura, fino ad ottenere un pool di cellule estremamente adese e clonogeniche. In realtà oggi sappiamo che non tutte le cellule aderenti siano effettivamente in grado di dare colonie, e come ogni colonia possa presentare, originando da un singolo e diverso precursore, caratteristiche peculiari, anche relativamente alla capacità

proliferativa. In altre parole, la popolazione cellulare del comparto midollare non ematopoietico è estremamente varia ed eterogenea, e non tutte le cellule individuate con questa metodica di isolamento possono essere realmente considerate cellule staminali indifferenziate. Per tale ragione sono state introdotte moderne tecniche di immunodelezione mediante anticorpi marcati e markers selettivi di superficie, al fine di isolare una popolazione cellulare il più possibile omogenea, primitiva ed altamente indifferenziata. Oggi esistono numerosi protocolli di immunoselezione che utilizzano anticorpi in grado di legare specifici antigeni di membrana delle cellule staminali adulte, quali CD146, CD133, CD29, CD44, CD90, CD71, CD106, CD120a, Cd 124. In particolare l'anticorpo STRO-1 è utilizzato in diversi protocolli selettivi. Si tratta di un marker specifico per popolazioni pre-osteogeniche, pre-condrogeniche, pre-adipogeniche. Strategie selettive che utilizzano combinazioni di anticorpi diretti contro CD106, CD146 e VCAM-1 stanno acquistando grande rilievo nell'isolamento delle cellule staminali indifferenziate adulte. Sono stati inoltre individuati l'antigene CD105 (endoglina), recettore per TGF-beta3, che lega l'antigene SH-2, e l'antigene CD73, che reagisce con SH-3 e SH-4. Strategie sempre più sofisticate, e che utilizzano combinazioni di anticorpi selettivi, vengono progettate per isolare cellule allo stato primitivo e altamente indifferenziate. Non ultima, una specifica caratteristica fenotipica delle cellule indifferenziate potrà naturalmente essere utile allo scopo di selezionare cellule di partenza assolutamente primitive. Per esempio l'espressione temporale di specifiche proteine quali fosfatasi alcalina e recettori per le BMPs è chiaro segno di avanzamento dello stadio differenziativo. E' noto infatti come l'interazione con le BMPs determini l'attivazione nella cellula staminale indifferenziata di quel complesso di geni che fanno capo a Cbfa-Osf 1 (Core binding factor-Osteogenic factor 1), responsabili della differenziazione verso la linea osteoblastica.

### **Espansione**

L'espansione cellulare è il passo successivo all'isolamento. Per poter correttamente espandere le cellule, mantenendole in uno stato indifferenziato, occorre controllare molteplici fattori, quali caratteristiche del mezzo di coltura, tempo di coltura, numero di passaggi, densità cellulare, presenza di siero autologo piuttosto che artificiale, aggiunta o meno di fattori di crescita o citochine. Abbiamo detto come il numero di cicli replicativi in vitro cui possono essere sottoposte le cellule staminali adulte sia notevole ma non infinito. Se sottoposte ad estesa replicazione in coltura, infatti, le cellule tendono ad andare incontro a senescenza, con progressiva perdita del potenziale proliferativo e riduzione della capacità differenziativa. In questo senso sembra che le caratteristiche di multipotenza possano essere mantenute anche dopo 23 cicli replicativi, e almeno la via di

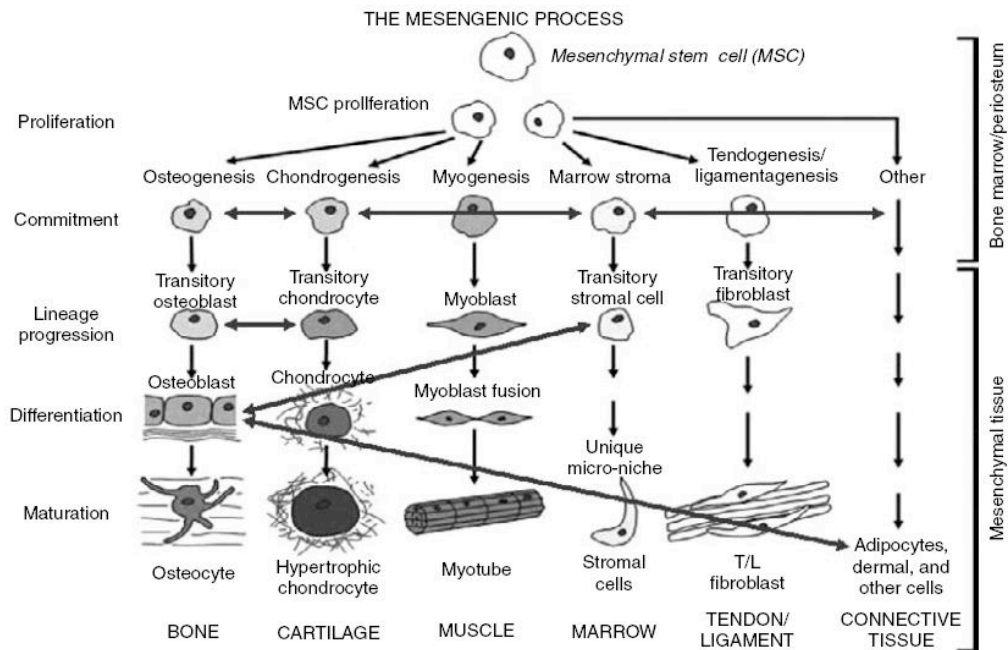
differenziazione osteogenica possa essere conservata, nonostante l'apparire di caratteri di senescenza. In verità recenti studi hanno dimostrato come il numero di replicazioni cui le cellule staminali adulte possono essere sottoposte prima di andare incontro a senescenza e perdita di potenzialità differenziative sia strettamente dipendente dalle caratteristiche originarie delle cellule isolate. Come già anticipato, infatti, sembra esistere una gerarchia all'interno delle cellule progenitrici, al cui apice troviamo un pool di cellule adulte con altissima capacità proliferativa, che possono essere coltivate in vitro per oltre 120 divisioni cellulari senza perdere potenziale proliferativo o differenziativo. In ogni caso a partire da 100-500 cellule è possibile, con soli 6 passaggi in coltura, ottenere un numero già molto elevato di cellule, fino a 500 milioni di unità. Alle cellule staminali adulte prelevate dal midollo osseo occorrono normalmente da 12 a 24 ore per poter completare il primo ciclo replicativo, con variabilità in base al sito del prelievo e all'età del donatore. Esse replicano più velocemente delle cellule staminali emopoietiche, e in modo non dissimile alle staminali embrionali, cui occorrono soltanto 36 ore. Il mezzo di coltura ideale è quello di Eagle con siero autologo addizionato con specifici fattori di crescita in grado di stimolare e accelerare la replicazione cellulare, come Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), che risulta essere un potente fattore in grado di aumentare la capacità proliferativa cellulare, senza influenzare lo stato differenziativo. FGF-2 aumenta significativamente la popolazione cellulare all'interno delle singole colonie e può ritardare, anche se non evitare, l'insorgere di segni di senescenza cellulare, caratteristica tipica dell'estesa replicazione in coltura. Per tale ragione l'impiego di questo fattore di crescita rappresenta la seconda risposta possibile e praticabile al problema della perdita del potenziale replicativo dopo estesi cicli proliferativi, o senescenza. Il problema della senescenza è legato all'erosione telomerica, caratteristica che contraddistingue le cellule sottoposte ad estesi cicli proliferativi. Un argomento di notevole interesse è rappresentato dall'induzione dell'attività delle telomerasi, al fine di potenziare la capacità replicativa delle cellule staminali adulte in coltura. La telomerasi è una ribonucleoproteina a trascrittasi inversa presente in natura in grado di prevenire la graduale perdita di sequenza che si verifica, divisione dopo divisione cellulare, a livello delle porzioni cromosomiche terminali, responsabile della perdita di potenziale replicativo e quindi della senescenza. Dal momento che l'accorciamento delle sequenze cromosomiche terminali causa la cessazione della proliferazione cellulare, lo stimolo all'attività delle telomerasi può riparare queste sequenze, divisione dopo divisione, in modo da permettere alle cellule di proliferare più a lungo senza mostrare senescenza. Le staminali adulte di derivazione dal midollo osseo mancano di attività telomerasica quando coltivate in vitro, differentemente dalle cellule emopoietiche. Questo aspetto rende le staminali stromali più difficili da trattare; oggi, tuttavia, l'induzione dell'attività

telomerasica attraverso vettori adenovirali in grado di portare sul bersaglio geni codificanti per questa proteina, permette di aumentare notevolmente il potenziale replicativo in coltura delle cellule stromali stesse. In sostanza, la trasduzione per via retrovirale delle cellule staminali di derivazione stromale con il gene umano per le telomerasi ha dimostrato di poter allungare i processi proliferativi cellulari fino addirittura a 260 duplicazioni cellulari, o mitosi, determinando inoltre per le cellule suddette la permanenza di uno stato altamente indifferenziato. Linee cellulari immortalizzate sono così prodotte come HMPC32F (Osyczka et al, 2002), in grado di proliferare molto più a lungo in vitro delle normali MSCs umane. Questa linea cellulare speciale è stata creata infettando le staminali adulte umane con il virus del Papilloma umano tipo 16 con i geni E6/E7 portati dal vettore virale. Queste linee cellulari si sono dimostrate virtualmente immortali dopo oltre un anno di estese replicazioni cellulari in vitro, mantenendo inalterato il proprio potenziale di senescenza e senza incorrere in alcun segno di senescenza. Tuttavia esse non sono mai state utilizzate in ambito clinico, nè sono state concepite per questi scopi.

### **Differenziazione**

La differenziazione delle cellule staminali adulte è il passo successivo alla proliferazione, e di maggior importanza. Numerosi studi in letteratura hanno dimostrato come cellule staminali adulte possano differenziarsi in coltura in osteoblasti, condrociti, adipociti, oltre che in miociti e tenociti.

**Fig. 3** Differenziazione e transdifferenziazione della linea mesenchimale



Un gran numero di lavori scientifici ha poi chiarito come le cellule staminali adulte isolate dal midollo osseo siano in grado di differenziarsi in svariate linee cellulari, benchè vi sia un indirizzo preferenziale di differenziazione verso la linea osteoblastica. Ciononostante è stato di recente dimostrato come cellule staminali adulte prelevate dal midollo osseo possano dare origine, sorprendentemente, anche a cellule cardiache, neurali, epatiche e renali. Questa plasticità, o capacità di transdifferenziazione, rappresenta un argomento di notevole interesse: come possono cellule staminali adulte di origine mesodermica differenziarsi in linee cellulari di derivazione ectodermica o addirittura endodermica? Una possibile risposta a questo quesito potrebbe essere determinata da gruppi di cellule circolanti nei diversi tessuti, in grado di rispondere a stimoli di natura propriamente ambientale, esprimendo conseguentemente un determinato fenotipo. Un'altra possibilità potrebbe essere rappresentata da meccanismi ancora poco conosciuti di fusione cellulare.

Ulteriori studi dovranno approfondire l'affascinante e complessa questione dell'interconversione o plasticità cellulare.

Lo scopo dell'Ingegneria Tissutale Ossea in chirurgia orale è quello di fare differenziare le cellule staminali adulte in osteoblasti attivi. Numerosi cocktails di fattori di crescita, aggiunti al mezzo di coltura, hanno dimostrato di essere in grado di stimolare la differenziazione osteogenica. La combinazione di dexametasone + acido ascorbico-2 fosfato + beta glicerofosfato, in quantità



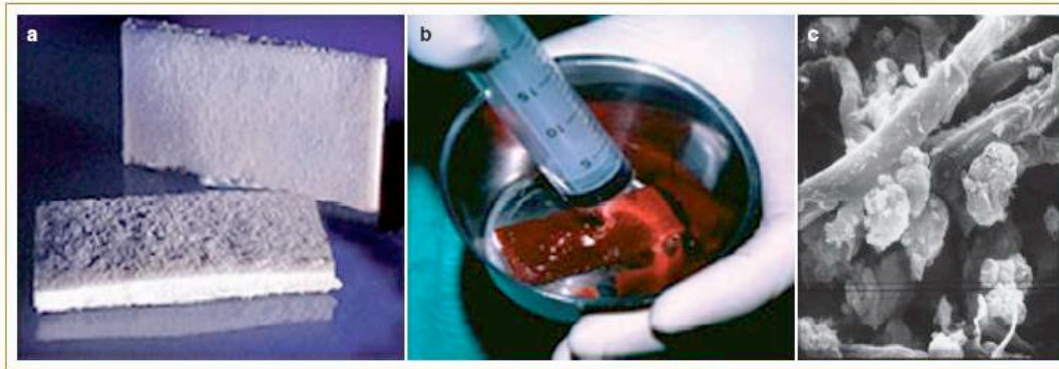
rispettivamente di 100nM + 50 microgrammi/ml + 100nM stimola la differenziazione delle cellule staminali adulte nella linea osteogenica. Le cellule trattate con questi fattori esprimono infatti dopo appena 7-14 giorni markers precoci di differenziazione come la fosfatasi alcalina; in tempi più lunghi l'esposizione a queste sostanze determina deposizione di matrice ed espressione di markers più specifici dello stato differenziativo quali sialoproteine ossee, osteocalcina e osteonectina. In verità il dexametasone è un glucocorticoide in grado di stimolare o inibire la differenziazione ossea in funzione del dosaggio. Infatti una dose troppo alta di dexametasone stimola la differenziazione adipogenica, mentre dosi più basse quella osteogenica. L'aggiunta di acido ascorbico-2 fosfato facilita la differenziazione e determina apposizione di collagene, oltre a potenziare gli effetti replicativi. Infine il beta glicerolfosfato è critico nello stimolare ed accelerare la calcificazione della matrice. Oltre a questi tre fattori principali, numerosi membri della famiglia delle Proteine Morfogenetiche dell'Osso (BMPs) sono stati utilizzati per indurre la differenziazione delle cellule staminali adulte, tra cui si ricordano in particolare BMP-2,-6,-9. La differenziazione è dipendente dalla dose somministrata di BMP-2, con effetti misurabili fra 25/100 nanogrammi/ml. Il potente stimolo osteogenico determinato dalle BMPs è dimostrato attraverso l'analisi di markers precoci della differenziazione, come appunto la fosfatasi alcalina, e naturalmente confermato istologicamente e immunohistochimicamente, attraverso la ricerca di markers tardivi di avvenuta differenziazione quali sialoproteine ossee, osteopontina, osteonectina e osteocalcina.

### **Scaffold**

Ad oggi conosciamo almeno quattro differenti strategie terapeutiche per poter veicolare, ove necessario, l'attività delle cellule staminali adulte. La prima prevede la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali ex vivo, in coltura, con successiva semina su matrice tridimensionale e impianto nel sito del difetto.

Questa via è certamente la più semplice da realizzare e la più sperimentata in passato, ma presenta un limite potenzialmente significativo, dato che le cellule vengono espanse e differenziate in un ambiente bidimensionale, dissimile da quello reale. La seconda prevede la proliferazione e la differenziazione cellulare direttamente nella matrice veicolante

**Fig. 4** Scaffold di collagene tipo I ricoperto con idrossiapatite prima dell'uso (a), semina staminali prelevate dal midollo (b), e immagine al microscopio elettronico della colonizzazione dello scaffold da parte delle cellule (c).

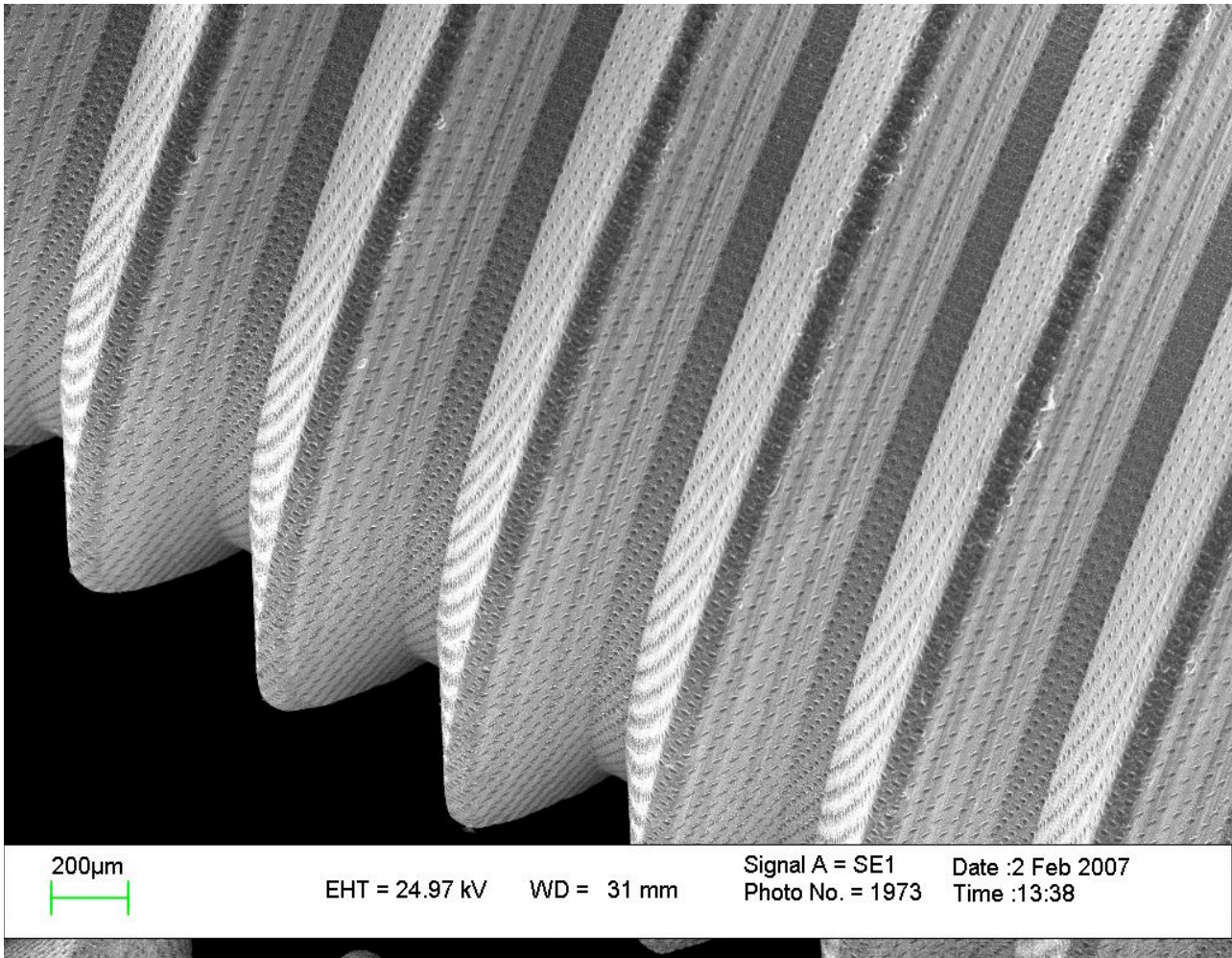


tridimensionale, e susseguente impianto nel sito del difetto. Questa via è certamente preferibile alla precedente, dato che la coltura e la differenziazione cellulare possono avvenire in un ambiente tridimensionale, molto più simile a quello reale, sotto stimoli ambientali che, come vedremo, rivestono un ruolo fondamentale nel determinare il destino cellulare.

Una terza opzione è rappresentata dalla proliferazione e parziale differenziazione ex vivo in coltura bidimensionale, semina sulla matrice veicolante e completamento delle fasi differenziative all'interno di essa, con successivo impianto. Infine, la quarta possibilità consiste nell'impiego di matrici gel iniettabili contenenti cellule staminali adulte. Com'è intuitivo quest'ultima opzione non rappresenta la soluzione ideale nell'ambito dell'Ingegneria Tissutale Ossea. Infatti, l'attività delle cellule staminali deve essere veicolata nel sito del difetto da un substrato solido adeguato, che possieda caratteristiche oggi ben note. Esso deve essere naturalmente biocompatibile, non immunogenico e non tossico. Deve possedere specifiche caratteristiche di natura fisica, chimica, biochimica e geometrica. Il substrato deve infatti in primo luogo garantire adeguato supporto meccanico e protezione alle cellule e non deve riassorbirsi troppo rapidamente, poichè un troppo veloce riassorbimento può rappresentare un impedimento piuttosto che un giovamento all'attività cellulare. Infatti, la matrice deposta dagli osteoblasti già differenziati deve poter andare incontro a mineralizzazione ed organizzazione, ed un troppo rapido ed esteso riassorbimento della struttura di sostegno può compromettere questo fondamentale passaggio. In secondo luogo il substrato deve sostenere chimicamente e biochimicamente le cellule, attraverso l'assorbimento sulla propria

superficie di molecole o fattori solubili endogeni, provenienti dal circolo ematico, che possano stimolare ed indirizzare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Parametri quali energia libera di superficie, carica elettrica e idrofobicità influenzano significativamente i meccanismi di adesione cellulare. E' noto infatti come l'assorbimento di molecole della matrice come fibronectina, vitronectina e osteopontina sia di fondamentale importanza nel mediare l'adesione delle cellule alla superficie del substrato. La fibronectina contiene infatti una specifica sequenza amminoacidica di legame denominata RGD, in grado di legare selettivamente le integrine, recettori cellulari transmembrana espressi da un gran numero di cellule, comprese le staminali adulte osteoprogenitrici e gli osteoblasti. Questo tipo di adesione è definita adesione focale e riveste grande importanza nel modulare le risposte cellulari. Le integrine, infatti, si rapportano tramite il proprio dominio citoplasmatico e attraverso specifiche proteine di legame come alfa-actinina, talina, vinculina, paxilina e tensina, a filamenti di actina del citoscheletro cellulare. Il citoscheletro è un complesso network di microfilamenti (actina), microtubuli (tubulina), e filamenti intermedi (vicentina, desmina, cheratina), tutti interconnessi in modo funzionale. Esso è un network di fibre in attività, generata da forze contrattili, per la contrazione dei filamenti di actina, tensione che viene controbilanciata da compressioni locali (adesione alla matrice extracellulare) e da forze interne. Riarrangiamenti interni a livello di questa struttura sono in grado di riflettersi immediatamente sull'espressione genica, determinando l'attivazione di specifiche cascate di chinasi intracellulari. In particolare *Osf/Cbfa1* ("osteoblast specific factor core binding factor 1") è un fattore di trascrizione critico e regola la differenziazione delle cellule staminali adulte in osteoblasti. Dal momento che modificazioni conformazionali a livello del citoscheletro possono determinare direttamente l'espressione di un dato fenotipo cellulare, è intuitivo come la geometria superficiale del substrato rivesta un ruolo di assoluta e primaria importanza a livello dei complessi meccanismi che regolano la differenziazione ossea.

**Fig. 5** Trasduzione dei segnali ambientali attraverso il citoscheletro regolano l'espressione fenotipica delle cellule staminali adulte.



Oggi sappiamo come il substrato ideale debba essere caratterizzato da elevata porosità, con diametro dei pori compreso tra 300-400 micron, esattamente come accade in natura nei canali haversiani, e presenza di una gran quantità di canali o tunnel di interconnessione, atti a garantire estesa comunicazione tra i vari pori. Questo tipo di porosità estesa, strettamente interconnessa, rappresenta infatti un ambiente ideale all'espressione del fenotipo osteogenico, come ormai oggi è ben documentato. Spazi porosi di questo tipo rappresentano, dal punto di vista cellulare, una sequenza ripetuta ed omogenea di concavità dal raggio di curvatura ideale. Le cellule infatti non sono in grado di riconoscere raggi di curvatura superiori a 500 micron, percependo queste superfici come piatte; riconoscono invece perfettamente concavità o spazi cavitari del raggio di curvatura inferiore ai 400 micron, e particolarmente tra i 250-300 micron di diametro. Esse aderiscono a queste superfici e ne subiscono l'influenza diretta, attraverso modificazioni nel numero, nella

frequenza e nella distribuzione spaziale degli attacchi focali; queste variazioni indotte dalla geometria superficiale determinano riarrangiamenti strutturali a livello del citoscheletro, che causano l'espressione del fenotipo osteogenico. In questo senso, il ruolo del citoscheletro è fondamentale, poiché esso integra diversi segnali di tipo fisico (forze locali trasmesse alla cellula) e li trasforma in segnali chimici, modulando e orchestrando globalmente la risposta cellulare all'ambiente esterno. Il citoscheletro è proprio scaffold meccanico-chimico, dotato di una propria integrità tensionale, con la peculiarità di essere parimenti struttura e catalizzatore. E' vero pertanto che la struttura, intesa come geometria superficiale e interna del substrato, possa dettare la funzione. Inoltre nelle concavità si realizza un insieme di eventi fondamentali, quali maggior concentrazione cellulare, accumulo di citochine e fattori di crescita, interconnessioni cellulari e una rapida creazione di un microambiente tridimensionale. Non deve sorprendere quindi il fatto che la prima enucleazione dell'osso avvenga nella cavità, come recentemente dimostrato da lavori anche sul titanio. Questo è infatti quello che avviene in natura, nel rimodellamento osseo, fenomeno geneticamente codificato e regolato, che caratterizza la vita di tutti gli organismi dotati di scheletro, da milioni di anni. Durante il rimodellamento osseo, gli osteoclasti riassorbono l'osso creando delle cavità, che sono immediatamente popolate da vasi ed osteoblasti in grado di deporre nuovo osso. La cavità rappresenta quindi un vero e proprio "motivo universale" del tessuto osseo, e scopo dei nuovi materiali dell'Ingegneria Tissutale Ossea è appunto quello di riprodurre il più possibile questa forma. Il substrato ideale, tuttavia, deve possedere caratteristiche di porosità interconnessa non solo per determinare specifiche risposte cellulari, ma anche per supportare un'adesguata invasione vascolare. Un adeguato apporto vascolare è infatti condizione necessaria a sostenere l'attività cellulare. La matrice porosa tridimensionale deve essere biofunzionale, sostenere e dirigere la crescita dei vasi al proprio interno successivamente all'innesto, favorire l'angiogenesi. Infatti la formazione di un complesso network vasale all'interno del substrato è condizione necessaria e imprescindibile affinché le cellule staminali adulte possano ricevere un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti, fattori di crescita ed ormoni. L'angiogenesi è prerequisito essenziale per l'angiogenesi, dal momento che senza un'adeguata tensione di ossigeno, di fattori solubili e nutrienti, le cellule staminali adulte non sono in grado di proliferare, nè tanto meno di differenziarsi verso la linea steoblastica. Per tale ragione grande importanza riveste la presenza di interconnessione tra gli spazi porosi, che devono essere diffuse e labirintiche, e non presentare assolutamente vicoli ciechi. Purtroppo la scarsa diffusione di ossigeno e nutrienti (limitata ai soli 150-200 micron di profondità) all'interno delle matrici tridimensionali rappresenta ad oggi un problema dal peso significativo, soprattutto nel caso di matrici di dimensioni superiori a 10

millimetri di diametro. Le cellule staminali presenti negli spazi profondi del substrato poroso, infatti, in assenza di sostegno vascolare adeguato, vanno in sofferenza e muoiono per ipossia in massa dopo soli 3 giorni. Diverse soluzioni possibili a questo problema sono state proposte: tra di esse, l'incorporazione nella matrice di potenti fattori pro-angiogenetici come VEGF ("Vascular endothelial growth factor"), la riduzione della sensibilità cellulare all'ipossia, la sistemazione del maggior numero di cellule negli strati esterni della matrice stessa, ben supportati dalla matrice vascolare.

### **Applicazione clinica**

Nel 2002 la Clinica Odontoiatrica dell'Università Milano-Bicocca ha presentato un protocollo di sperimentazione clinica sull'uomo: "Tissue Engineering: Development of New Strategies for Periodontal and Alveolar Bone Regeneration by Using Haematopoietic-Derived Mesenchymal Cells in Animal and Human. Evaluation of Systemic Effects", terminato e ammesso a valere sul FIRB, che prevede l'innesto di cellule staminali adulte nelle ossa mascellari per rigenerare il tessuto osseo perduto. Il razionale scientifico che ha guidato questa ricerca è stato la necessità di indagare nuove tecniche e materiali per la terapia della malattia parodontale, un tempo chiamata piorrea. Si tratta di una patologia endemica, che presenta un'alta incidenza nella popolazione adulto-geriatrica e degli alti costi sociali; essa, infatti, determina la distruzione dei tessuti di supporto dei denti (in particolar modo l'osso) e la necessità, quindi, di ricorrere a riabilitazioni protesiche. Prima dell'utilizzo sull'uomo, tuttavia, è stata necessaria una sperimentazione *in vitro* e *in vivo* su animale, terminata e ammessa a valere sul FIRB, per verificare l'effettiva capacità delle cellule staminali di proliferare e differenziare verso la linea osteogenetica e di rigenerare il tessuto osseo in difetti creati artificialmente. I risultati positivi hanno permesso di ottenere l'autorizzazione da parte dell'Istituto Superiore di Sanità e del Comitato Etico dell'Ospedale San Gerardo per l'utilizzo sull'uomo.

Lo studio effettuato è uno studio di fase 1 su un numero limitato di pazienti, il cui scopo principale è la valutazione della tossicità dell'approccio sperimentale proposto e della fattibilità di produzione, in condizioni GMP, del prodotto cellulare oggetto dello studio. L'obiettivo principale è lo studio della biocompatibilità e tossicità *in vivo* delle cellule staminali di origine mesenchimale differenziate in senso osteoblastico, sostenute da scaffold di collagene biomimetici in pazienti affetti da parodontopatia severa. Pur essendo uno studio di fase 1, tuttavia tale sperimentazione permette di analizzare degli end-point secondari di risposta, ottenendo dati preliminari utili per la concezione di studi di fase 2 su un campione di pazienti più esteso. Tali end-point secondari sono rappresentati da:

- Valutazione della potenzialità rigeneratrice delle cellule staminali di origine mesenchimali, misurata mediante i dati radiografici, clinici e strumentali (sonda parodontale, in grado di misurare la profondità della tasca parodontale).
- Valutazione del beneficio clinico della procedura sperimentale tramite controllo clinico protratto nel tempo.

In questo studio sono stati reclutati 7 individui, che dovevano soddisfare i criteri di inclusione sottoelencati. Il centro coinvolto è stato esclusivamente la Clinica Odontoiatrica dell'Ospedale San Gerardo di Monza.

#### Criteri di inclusione

- Malattia parodontale severa;
- Nessun trattamento parodontale disponibile per severità della malattia;
- Prova radiografica di riassorbimento verticale dell'osso inferiore a 8 mm;
- Almeno un sito parodontale per quadrante avente Indice Gengivale (GI)  $\geq 2$ ;
- Profondità di tasca parodontale (PPD) inferiore a 8 mm;
- Età compresa tra i 30 e 50 anni;
- Disponibilità a terminare lo studio;
- Accettazione del consenso informato;

#### Criteri di esclusione

- Gravidanza, insufficienza renale acuta, mieloma multiplo, artrite e collagenopatie, fibrosi polmonare, enfisema, tumori, osteoporosi, intervento chirurgico recente (1 mese), malattie infiammatorie croniche, condizione infettiva recente, disordini neurologici e/o disautonomici conosciuti, tiroide, ematopatie, depressione o disturbi dell'alimentazione;
- Elementi con difetti circonferenziali e/o i denti con i lesione periapicale;
- Stato allergico conosciuto ai prodotti in studio;
- Pazienti dopo trattamento antitumorale o con malattie severe a carico della struttura ossea
- Condizione o storia medica che impone profilassi antibiotica prima del trattamento dentale, (e. g., febbre reumatica, malattie reumatiche del cuore, prolasso della valvola mitrale, disfunzione valvolare, ipertrofia cardiaca, endocardite batterica, difetto congenito del cuore, valvola cardiaca o altri manufatti protesici in altri distretti anatomici[anca], etc... );
- Abuso di alcool o/e droghe;
- Severo bruxismo;

Il prodotto sperimentale proposto consiste di cellule mesenchimali autologhe (isolate ed espanse da

prelievo di midollo osseo) differenziate in senso osteoblastico, deposte su scaffold biodegradabile in collagene.

L'intera fase di produzione ed uso clinico consiste nelle seguenti procedure:

- 10-15 mL di midollo osseo sono prelevati dalla cresta iliaca posteriore del paziente e trasportati nel laboratorio di terapia cellulare e genica Stefano Verri.
- Le MSC sono isolate ed espanse nel laboratorio Stefano Verri. Le cellule sono mantenute in coltura fino al raggiungimento di un numero di cellule adeguato in base all'entità del difetto osseo di ciascun singolo paziente. Un'aliquota cellulare è utilizzata per la caratterizzazione fenotipica, mentre un'aliquota di surnatante è riservata per i test microbiologici (endotossina, micoplasma, batteri aerobi e anaerobi). Le cellule vengono deposte su scaffold Gingistat alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  MSC/125mm<sup>3</sup> scaffold e, dopo tre giorni, indotte al differenziamento in senso osteogenico mediante mezzo osteogenico clinical-grade, consistente di DMEM GMP-grade, 10% FBS Hyclone, antibiotici GMP-grade, L-glutamina GMP-grade con l'aggiunta dei fattori differenzianti 100 nM desametasone, 0.05 mM vitamina C, e 10 mM sodio glicerofosfato (Farve). In parallelo agli scaffold, un'aliquota cellulare di controllo è piastrata anche su dishes e indotta a differenziamento con mezzo osteogenico clinical-grade al fine di eseguire le opportune valutazioni di differenziamento osteoblastico. A partire dal 21 giorno, e non oltre il 42 giorno, con scadenza settimanale, viene effettuata la colorazione Alizarin Red sulle dishes di controllo per osservare l'inizio del processo di mineralizzazione che coincide con l'iniziale positività di comparsa del colorante Alizarin Red. Nel giorno in cui si osserva un inizio di colorazione su piastra, uno scaffold di controllo viene congelato ed analizzato, al fine di avere una più corretta ed adeguata valutazione del grado di differenziamento sul materiale biodegradabile da inoculare nel paziente. Se il prodotto viene ritenuto idoneo, quindi solo se ha iniziato il processo di differenziamento in senso osteogenico, il medico odontoiatra viene avvisato e viene programmato l'intervento chirurgico in un tempo prevedibile di 1-3 giorni, mentre nel contempo saranno effettuati i controlli microbiologici opportuni (endotossina, micoplasma, colture anaerobi ed aerobi). Il dato relativo alla negatività per l'endotossina sarà l'unico dato disponibile per il rilascio del lotto cellulare ad uso clinico. I dati relativi all'esame colturale del micoplasma e dei batteri/miceti aerobi-anaerobi viene reso noto al clinico solo ad inoculo avvenuto (vista la necessità di utilizzare il prodotto fresco e l'impossibilità ad operare qualunque procedura di conservazione a freddo o di congelamento).
- Una settimana-10 giorni prima dell'impianto dello scaffold



Trattamento parodontale completo con procedure non chirurgiche mediante le curettes di Gracey ed irrigazioni con clorexidina, in anestesia locale e senza scolpitura di un lembo chirurgico.

Giorno dell'impianto dello scaffold

Dopo le radiografie delle arcate dentali per la valutazione del difetto, viene effettuato il trattamento parodontale chirurgico per la rigenerazione tissutale. La procedura chirurgica prevede l'incisione intrasulculare con fibrotomia delle fibre transeptali eseguita mediante un bisturi; con le curettes di Gracey si esegue la levigatura radicolare da parte dell'operatore. Si rimuove il tessuto di granulazione ed i deficit ossei vengono riempiti con lo scaffold collagenico (® di Gingostat - VEBAS) in cui sono state deposte e differenziate in senso osteogenico  $1 \times 10^6$  MSCs. Si suturano i bordi del lembo chirurgico per permettere una guarigione di prima intenzione e per permettere il riempimento dello scaffold da parte della matrice ossea. Viene eseguita una radiografia post-operatoria. Il ricercatore raccoglie in cartella i dati relativi ai parametri clinici intraoperatori.

Giorno dopo dell'impianto:

Viene osservato il cavo orale del paziente per il controllo della ferita.

Una settimana dopo l'impianto:

Viene effettuata la rimozione delle suture il controllo della ferita, il controllo dell'occlusione e la valutazione ematochimica (emocromo, funzionalità epatica e renale).

- Il controllo della ferita, il controllo dell'occlusione e la valutazione dei parametri ematochimici vengono effettuati secondo le scadenze riportate nella tabella del paragrafo X. Per un controllo radiografico vengono eseguite radiografie endorali e OPT a scadenze indicate in tabella del paragrafo X. Contestualmente alle radiografie vengono eseguite foto endorali del paziente come descritto in tabella del paragrafo X.

Il numero di cellule mesenchimali proposto nel corrente studio sperimentale (un milione di cellule per  $125 \text{ mm}^3$  di scaffold) è stato scelto in base ai dati riportati in letteratura in protocolli analoghi di rigenerazione ossea in modelli pre-clinici (18-21). Il numero di scaffold (e quindi di cellule staminali mesenchimali) prodotti per ciascun paziente varia in ragione dell'entità del singolo difetto osseo e del numero delle lesioni presenti in ciascun paziente. Si prevede che l'entità in termini di profondità della singola lesione non superi la misura massima di 1 cm (misura al di sopra della quale non si ritiene proponibile un intervento di riparazione cellulare in quanto troppo estesa e quindi candidabile ad intervento di rimozione dentaria). Il numero delle

lesioni per ciascun paziente è estremamente variabile in relazione alla gravità ed all'estensione della malattia parodontale. Il numero di lesioni candidabili all'inserimento del prodotto cellulare varierà in funzione del numero di scaffold prodotti. La priorità viene assegnata alle lesioni più gravi con tasche di maggior profondità.



## SCOPO DELLA TESI

In questo studio preliminare il nostro primo obiettivo è stato quello di valutare se il titanio da solo potesse rappresentare un fattore induttivo sufficiente a stimolare la differenziazione delle cellule staminali in osteoblasti. L'obiettivo secondario è stato quello di valutare il grado di differenziazione delle cellule staminali sulla superficie modificata al laser *in vitro*, paragonando i risultati alle superfici sabbiate e macchinate. L'obiettivo terziario è stato di stimare la stabilità di adesione delle cellule staminali differenziate sulla superficie in titanio modificata al laser.

## **I ESPERIMENTO**

### **MATERIALI E METODI**

#### **1. Isolamento delle cellule e coltura**

Le cellule staminali mesenchimali (hMSCs) sono state prelevate dal midollo eparinizzato di un individuo sano sottoposto a prelievo di midollo per trapianto allogenico presso l'Ospedale San Gerardo (Monza, Italia), dopo aver ottenuto il suo consenso. Le cellule mononucleari sono state isolate attraverso la centrifugazione in un gradiente Ficoll-Hypaque, sospese in un terreno di Eagle modificato da Dulbecco a bassa concentrazione di glucosio (LG-DMEM; *Euroclone, Milano, IT*), contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS; *Hyclone, Logan, UT*), L-glutamina 2mM, penicillina 100U/ml, streptomycina 100µg/ml, fungizone 250µg/ml (*Lonza, Verviers, Belgio*) e posizionate in piatti di coltura alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/cm<sup>2</sup>. Le colture di hMSCs sono state mantenute a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente 5% CO<sub>2</sub> e il terreno è stato cambiato due volte a settimana. Quando le colture hanno raggiunto circa l'80% di confluenza, le cellule sono state lavate due volte con Soluzione tampone fosfato salina di Dulbecco (PBS; *Sigma-Aldrich, st. Louis, MO*), staccate con soluzione tripsina/EDTA allo 0.05% (*Lonza, Veviers, Belgio*) e usate nell'esperimento o ripiastrate in piatti di coltura di 75 cm<sup>2</sup>.

Come descritto dalla Società Internazionale di Terapia Cellulare [9], le cellule erano aderenti alla plastica, positive per CD105, CD73, CD90, negative per CD34, CD45 e in grado di differenziare in osteoblasti, adipociti e condrociti.

## **2. Preparazione dei dischi in titanio**

Sono stati usati dischi del commercio in titanio puro di grado 4, con un diametro di 6mm ed un'altezza di 2.5mm. Le superfici sono state trattate in tre diversi modi: 1) macchinata (M); 2) sabbiata con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a grana 100; 3) trattata al laser con pori di 20 µm di diametro ed altezza di 30 µm (L). (fig. 3a-b-c)

Dopo il trattamento di superficie il campione è stato lavato con una soluzione surfactante al 3%, risciacquato con acqua ultrapura ed infine sterilizzato con radiazioni-β. Il sistema laser utilizzato per il trattamento dei dischi comprende una fonte di luce laser, una testa di scansione ed un supporto per il disco assemblato in modo da mantenere, posizionare e muovere il dispositivo durante la processazione. Il generatore laser è un DPSS (Diode Pumped Solid State) lavorante in regime Q-switching (nanosecond pulses duration). Questo laser permette la formazione, durante il movimento dello scanner, di una sequenza di pori, attraverso la sincronizzazione appropriata della velocità e della frequenza di pulsazione.

## **3. Coltura delle cellule staminali sui dischi in titanio e differenziazione osteogenetica**

I dischi in titanio sono stati posizionati sul fondo di 24 piastre e le hMSCs sono state messe in coltura con densità di 10000 cellule/cm<sup>2</sup> in LG-DMEM addizionato con 10% FBS. Per valutare la capacità adesiva e differenziativa sulle diverse superfici, sono state scelte tre tipologie di trattamento di superficie del titanio: superficie macchinata, superficie sabbiata e superficie modificata al laser.

Per indurre la differenziazione osteogenetica, le hMSCs sono state coltivate in un terreno inducente, consistente in un LG-DMEM addizionato con 10% FBS, al quale sono stati aggiunti 100nM di desametasione, 10 mM β-glicerolfosfato e 0.05 mM acido ascorbico 2-fosfato (*Sigma-Aldrich, st. Louis, MO*) (gruppo test). Le cellule staminali inserite nel terreno LG-DMEM addizionato con 10% FBS, senza alcun fattore inducente, sono state usate come gruppo controllo.

## **4. Colorazione con Alizarina e valutazione quantitativa**

La differenziazione in senso osteogenetica è stata valutata con colorazione mediante Rosso di Alizarina S al 28°, 38°, 42°, 49°, 56° e 63° giorno dall'induzione. Il colorante si lega agli ioni calcio presenti all'interno della matrice mineralizzata, conferendo alla stessa un colore rosso brillante.

Le cellule sulla superficie in titanio sono state risciacquate con PBS e fissate con paraformaldeide 4% per 10 minuti. In seguito le cellule sono state lavate con acqua bidistillata ed incubate in una soluzione contenente Rosso di Alizarina S (*Sigma-Aldrich, st. Louis, MO*) e 1% idrossido di ammonio per 30 minuti a temperatura ambiente, sotto agitazione. Dopo l'incubazione, i dischi in titanio sono stati lavati due volte con acqua bidistillata, asciugate con aria e fotografati.

Per la valutazione quantitativa della differenziazione osteogenetica, la colorazione è stata quantificata con uno spettrofotometro ( $A_{405}$ ) dopo solubilizzazione con sodio dodecil-fosfato in 0.5M HCl [10].

## **RISULTATI**

Al 28° giorno abbiamo iniziato la valutazione quantitativa attraverso l'eluizione del Rosso di Alizarina presente sia sui dischi in titanio inseriti nel terreno osteogenetico, sia dei dischi nel terreno privo di fattori inducenti. I risultati dei valori di assorbanza del gruppo controllo sono esposti nella tabella I, mentre i valori di assorbanza del gruppo test sono enunciati nella tabella II.

Possiamo osservare come i valori di colorazione con Rosso di Alizarina dei dischi del gruppo controllo siano tutti inferiori a 0.1, per ogni superficie, sia dopo 28 giorni che dopo 38 e 42 giorni.

Nella tabella II, le cellule coltivate nel terreno addizionato con 100nM di desametasione, 10 mM  $\beta$ -glicerolfosfato e 0.05 mM acido ascorbico 2-fosfato mostrano valori di assorbanza decisamente superiori, dimostrando un buon grado di differenziazione.

La progressione della differenziazione è stata quindi studiata per tutte le superfici ed i valori sono riportati in tabella III. Abbiamo osservato che il comportamento delle cellule era simile per tutte e tre le superfici (figura 4): si verificava un incremento della differenziazione durante il primo periodo (fino alla sesta o settima settimana) e quindi un veloce decremento della differenziazione (fino alla nona settimana) dopo il picco. La superficie modificata al laser mostrava il suo picco differenziativo dopo 42 giorni (figura 5), mentre le superfici macchinata e sabbiata mostravano il picco differenziativo dopo 49 giorni (figure 6 e 7). Inoltre la caduta dei valori di assorbanza per la

superficie modificata al laser era più lenta della caduta dei valori di assorbanza sulle altre due superfici (figura 8).

I valori per la superficie macchinata tendevano allo 0, mentre sia la superficie modificata al laser che la superficie sabbiata tendevano a stabilizzarsi intorno ad un plateau corrispondente al valore 0.4.

## **DISCUSSIONE**

Nel nostro dipartimento di Neuroscienze abbiamo provato a riprodurre in vitro le prime fasi dell'osteointegrazione artificialmente, verificando il grado di differenziazione delle cellule staminali.

Le sostanze additive per la determinazione del terreno osteogenetico sono state scelte in accordo con il protocollo di Pittenger *et Al.*, che nel 1999 ha esaminato le potenzialità differenziative delle cellule staminali mesenchimali umane, definendo il preciso terreno di coltura in grado di indurre la

differenziazione osteogenetica in vitro. [11] Gli Autori hanno identificato nel desametasone, nel  $\beta$ -glicerolfosfato e nell'ascorbato gli elementi con la capacità di indurre la differenziazione delle hMSCs in osteoblasti, invece che in condroblasti o adipociti.

Il Titanio è ad oggi considerato il materiale metallico maggiormente biocompatibile. Recentemente, nel 2006 e nel 2009, due studi, condotti rispettivamente da Stiehler *et Al.* e Myllymaa *et Al.*, hanno esaminato l'influenza di diversi metalli sulle capacità adesive, proliferative e differenziative delle cellule staminali. [12, 13] In particolare, gli Autori hanno focalizzato l'attenzione sul Tantalio e sul Cromo, paragonando i risultati ottenuti al Titanio, ma sono arrivati alla conclusione che nessun altro materiale possiede la medesima affinità con le cellule staminali rispetto a quest'ultimo. I risultati in termini di differenziazione, infatti, ne confermano la biocompatibilità.

Abbiamo deciso di iniziare la nostra analisi dal 28° giorno dal momento che la colorazione della matrice mineralizzata con Rosso di Alizarina diventa ben apprezzabile dopo 3-4 settimane ed, inoltre, il nostro scopo era di analizzare la differenziazione delle cellule, e non la proliferazione. Abbiamo deciso di non analizzare l'attività enzimatica della Fosfatasi-alcalina perché questo rappresenta un indicatore precoce, mentre noi eravamo interessati all'analisi della differenziazione nel lungo periodo.

Abbiamo valutato la differenziazione alla fine di ogni settimana, iniziando dalla quarta, ma alla fine della quinta settimana abbiamo avuto un problema tecnico che ha causato la chiusura del Dipartimento e per tale motivo l'analisi è stata ritardata di 3 giorni (38° giorno invece che 35°).

La superficie modificata al laser e la sabbiata, poste all'interno di un terreno osteogenetico, mostravano un elevato grado di differenziazione, paragonato alla superficie macchinata, come mostrato dalle curve nella figura 8. Questo significa che la modificazione delle superfici implantari ha una grande influenza sull'adesione e la differenziazione delle cellule staminali e, conseguentemente, sullo sviluppo della stabilità secondaria [14 - 17]. Il picco della curva blu, rappresentante la superficie modificata al laser, è al 42° giorno, una settimana prima dei picchi per le altre due superfici, e questo può essere interpretato come un'affinità migliore tra gli osteoblasti ed i pori prodotti dal trattamento laser della superficie in titanio.

Il rapido decremento della differenziazione osservato per tutte le superfici dopo il picco è stato attribuito dai biologi al grande grado di proliferazione nei confronti delle dimensioni relativamente piccole dei piatti convenzionali. Per questa ragione, le cellule (che non erano tumorali, ma sane) reagiscono alla troppo elevata densità con un'inibizione da contatto, che causa il distacco delle stesse l'una dall'altra e dal titanio.

## CONCLUSIONI

Prima di affermare qualsiasi conclusione, è necessario ricordare che questo studio è un lavoro preliminare *in vitro*, senza alcun significato statistico, volto all'analisi del comportamento delle cellule staminali su una superficie in titanio con caratteristiche particolari, data l'assenza in letteratura di dati in tal senso.

I dati ottenuti, che potrebbero essere anche dovuti al caso da un punto di vista statistico, ci danno delle indicazioni, che solo attraverso l'ampliamento del campione e la misurazione di un valore medio e di una deviazione standard, potranno essere confermati ed analizzati a fondo.

In risposta al primo obiettivo proposto, possiamo affermare che il Titanio da solo non può essere considerato un fattore induttivo sufficiente a causare la differenziazione in senso osteogenetico delle cellule staminali mesenchimali umane.

In secondo luogo, la modificazione al laser del titanio potrebbe aumentare la velocità di differenziazione delle cellule staminali, rispetto al trattamento macchinato o sabbiato. Questo può essere tradotto, da un punto di vista clinico, con una riduzione del periodo della flessione della stabilità e, quindi, minori possibilità di fallimento implantare.

Ciò è anche confermato dalla diminuzione della differenziazione, che è più lenta nella superficie modificata al laser, dove tende ad un plateau intorno a 0.4. Questa reazione può essere interpretata come una migliore affinità di legame tra gli osteoblasti ed il titanio trattato, in confronto allo stesso tipo di connessione con la superficie sabbiata e macchinata.

Studi futuri, già iniziati dalla nostra equipe, sono volti alla conferma di questi dati con un campione più grande di dischi in titanio: per ogni time-point saranno analizzati più dischetti per ogni superficie in modo da misurare un valore medio e la deviazione standard. In seguito, gli Autori intendono verificare questi risultati utilizzando campioni di cellule staminali prelevati da diversi individui: in questo modo si può verificare se cellule provenienti da diversi pazienti presentino lo stesso comportamento nelle differenti superfici.



## II ESPERIMENTO

### MATERIALI E METODI

Sono identici al primo, ma sono state utilizzate tre linee cellulari umani e oltre ad una analisi quantitativa con colorazione con Alzarin Red si è eseguita una ulteriore valutazione quantitativa con ELISA per il dosaggio.....

### ELISA

**ELISA** è un acronimo che è derivata dall'espressione in inglese *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (**Saggio Immuno-Assorbente legato ad un Enzima**). Si tratta di un versatile metodo d'analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima. La sostanza da rilevare può essere un antigene appartenente ad un patogeno od una molecola più piccola, chiamata aptene, come per esempio per riconoscere la presenza di steroidi. Se invece di un enzima, viene usato un radionucleide (spesso l'iodio-125) per rilevare la positività del test, si parla di RIA dall'inglese (radio-immuno assay).

Il saggio ELISA trova anche ampio uso per accertare la presenza di anticorpi contro un determinato antigene nel plasma sanguigno del paziente per accertarsi se c'è stata una esposizione ad un determinato patogeno. Questo avviene nel test per l'HIV per accertarsi se il sistema immunitario del soggetto si è trovato a confrontare il virus dell'AIDS.

Ci sono diversi varianti del test ELISA. Che si differenziano secondo il componente che si vuole rilevare. Nel test diretto viene determinata la presenza dell'antigene, in quello indiretto, la presenza

di anticorpi contro l'antigene. Il saggio può essere *competitivo* o *non competitivo*. L'ELISA non competitivo diretto si effettua secondo diverse metodiche: semplice e sandwich ELISA.

Nel metodo semplice l'antigene è assorbito sulla placca e rilevato con un anticorpo marcato da un enzima. Nel metodo a sandwich l'anticorpo che è usato per catturare l'antigene è assorbito sulla placca, gli anticorpi assorbiti sono in seguito esposti al fluido che potrebbe contenere l'antigene ed un secondo anticorpo, marcato, viene aggiunto per rilevare che l'antigene è stato catturato. In questo secondo caso, gli epitopi sull'antigene dei due anticorpi devono essere completamente distinti senza alcuna sovrapposizione (vedi figura).

**Fig. Struttura cristallografica che esemplifica un saggio sandwich *ELISA* per quantificare la concentrazione PSA o antigene della prostata[1].** (1) L'anticorpo di cattura sotto forma di frammento Fab 5D3D11 (celeste/verde) corrisponderebbe all'anticorpo assorbito sulla placca. (2) Nella seconda fase l'antigene (marrone) viene catturato e (3) rilevato da un secondo anticorpo 5A5D5 che in un vero test sarebbe legato ad un enzima.

### **Metodo diretto**

Il metodo diretto sandwich prevede la copertura del fondo del pozzetto con un anticorpo specifico per l'antigene che vogliamo misurare. Si esegue un lavaggio. In seguito si introduce l'antigene, che si legherà all'anticorpo. Si lava ulteriormente per togliere antigeni in eccesso. Si introduce un anticorpo specifico che legherà il complesso anticorpo+antigene, formando un triplo strato da cui prende il nome il test. All'ultimo anticorpo che abbiamo aggiunto, era legato un enzima specifico, e aggiungendo il suo substrato si formerà un prodotto colorato, che evidenzierà il pozzetto.

le fasi in sintesi prevedono:

1. Immissione di una soluzione dell'anticorpo primario, specifico per l'antigene da ricercare ed individuare nel siero o in un dato liquido biologico, nei pozzetti di una apposita piastra da saggio in polistirene. Il fondo del pozzetto viene saturato con l'anticorpo che aderisce al fondo dei pozzetti e l'eccesso viene lavato via.
2. Aggiunta, in soluzioni con diverse concentrazioni non note, dei campioni dei quali bisogna saggiare la presenza, o meno, dell'antigene caratteristico dell'organismo patogeno e lavaggio con soluzione tampone; L'antigene, se presente, si lega specificamente con l'anticorpo e l'eccesso viene lavato via.
3. Aggiunta dell'anticorpo secondario, che può essere rappresentato da un anticorpo anti-immunoglobuline umane, che possono essere ottenute da animali di grossa taglia inoculando in essi siero umano (le cui proteine sono riconosciute come antigeni estranei al sistema immune dell'animale e quindi determinano la formazione di anticorpi). Questo anticorpo viene coniugato con un enzima, tipicamente perossidasi o fosfatasi alcalina, e lavaggio con soluzione tampone; L'anticorpo secondario si lega selettivamente all'antigene, se presente, e l'eccesso viene lavato via. L'assenza dell'antigene specifico per l'anticorpo comporta che l'anticorpo secondario (e il relativo enzima ad esso coniugato), con il lavaggio, venga dilavato.
4. Se l'enzima usato è la fosfatasi alcalina si aggiunge come substrato p-nitrofenilfosfato; Questa sostanza provoca una reazione con la fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo secondario producendo p-nitrofenolo di colore giallo. Se l'antigene caratteristico dell'organismo patogeno è assente nel pozzetto non vi sarà neanche l'enzima coniugato all'anticorpo secondario e quindi la reazione non può avvenire.
5. Aggiunta di idrossido di sodio per bloccare la reazione tra enzima fosfatasi e p-nitrofenilfosfato;
6. Lettura del risultato, espressione della reazione tra enzima fosfatasi e p-nitrofenilfosfato che produce sul substrato una reazione cromogenica o fluorogenica - ovvero sviluppo di colore o luce di fluorescenza - successivamente misurabile attraverso uno spettrofotometro.

Lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene che si voleva saggiare e l'intensità della colorazione, misurabile grazie al spettrofotometro, è semi-quantitativa secondo una scala arbitraria di intensità.

Al fine di validare il test, le operazioni sopra riportate vengono effettuate in due pozzetti distinti che differiscono per il tipo di anticorpo primario che viene introdotto inizialmente: un pozzetto viene

riempito con l'anticorpo specifico per l'antigene che si vuole individuare, mentre l'altro viene saturato con un anticorpo non specifico. Affinché il test possa ritenersi valido, in primo luogo deve risultare negativo in quest'ultimo pozzetto e nel caso in cui il campione biologico saggiato contenga realmente l'antigene d'interesse, il test deve essere positivo nell'altro pozzetto, quello saturato con l'anticorpo primario specifico.

Il test ELISA NON COMPETITIVO è un test qualitativo e semi-quantitativo: non fornisce un valore effettivo ma afferma la presenza o l'assenza dell'analita. Il test ELISA COMPETITIVO è invece un test quali-quantitativo: fornisce un valore specifico con una deviazione standard.

### **Metodo indiretto**

Il metodo indiretto invece, in via teorica, funziona così: innanzi tutto si copre il fondo del pozzetto con l'antigene specifico per l'anticorpo che vogliamo misurare. Si lava via l'eccesso per eliminare l'indesiderato. Si aggiunge il siero(campione) che si pensa contenga gli anticorpi per quell'antigene adsorbito al fondo del pozzetto. Si lava via l'eccesso ancora una volta. Si aggiunge un secondo tipo di anticorpo (marcato con un enzima), che legherà il complesso antigene(adsorbito)+anticorpo(del campione) se sono presenti gli anticorpi nel campione. Il secondo anticorpo è quindi un anti-anticorpo. Si effettua un lavaggio per eliminare eventuali anticorpi non legati al complesso (quelli combinati resistono invece al lavaggio). Infine si aggiunge il substrato dell'enzima con cui è stato marcato l'anti-anticorpo: un cambiamento di colore indica la presenza degli anticorpi nel siero (nel campione), visto che l'enzima usato agisce sul substrato modificandolo, in maniera che assorba la luce e risulti colorato.[1]

Ha lo scopo di ricercare specifici anticorpi in un dato liquido biologico avendo a disposizione antigeni a cui questi possano legarsi o, al contrario, per ricercare specifici antigeni avendo a disposizione anticorpi monoclonali che possano legarsi a questi ultimi.

In caso di esito positivo, per conferma si esegue il Western Blot.

### **Innovazioni**

La **Multiple & Portable ELISA (M&P ELISA)** usa una conformazione innovativa della fase solida: un'astina di polistirene da cui protrudono 8 o 12 ogive. L'intera astina va introdotta direttamente nel campione da saggiare e tutti i passaggi successivi (lavaggi, incubazione in coniugato e incubazione in cromogeno) sono eseguiti semplicemente immergendo le ogive dell'astina - estratta dal campione dopo opportuna incubazione - in pozzetti di micropiastre o microstrip standard, pre-riempiti con le soluzioni e i reagenti. Gli importanti vantaggi sono:

- l'astina introdotta nel campione ha le ogive sensibilizzate con reagenti differenti, in modo che in ciascun campione sia possibile la ricerca simultanea di differenti anticorpi e/o di differenti antigeni, per analisi multiple o per multi-screening;
- il volume del campione analizzato può essere aumentato per aumentare la sensibilità del test in campioni clinici (sangue, saliva, urine), alimentari (latte di massa, pool di uova) e ambientali (acqua);
- un'ogiva di ogni astina non è sensibilizzata e funge da controllo negativo, per valutare la specificità per tutti i test di ricerca di anticorpi e/o antigeni eseguiti nel campione in esame;

## **MATERIALI E METODI**

### **1. Isolamento delle cellule e coltura**

Le cellule staminali mesenchimali (hMSCs) sono state prelevate dal midollo eparinizzato di un individuo sano sottoposto a prelievo di midollo per trapianto allogenico presso l'Ospedale San Gerardo (Monza, Italia), dopo aver ottenuto il suo consenso. Le cellule mononucleari sono state isolate attraverso la centrifugazione in un gradiente Ficoll-Hypaque, sospese in un terreno di Eagle modificato da Dulbecco a bassa concentrazione di glucosio (LG-DMEM; *Euroclone, Milano, IT*), contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS; *Hyclone, Logan, UT*), L-glutamina 2mM, penicillina 100U/ml, streptomina 100µg/ml, fungizone 250µg/ml (*Lonza, Verviers, Belgio*) e posizionate in piatti di coltura alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/cm<sup>2</sup>. Le colture di hMSCs sono state mantenute a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente 5% CO<sub>2</sub> e il terreno è stato cambiato due volte a settimana. Quando le colture hanno raggiunto circa l'80% di confluenza, le cellule sono state lavate due volte con Soluzione tampone fosfato salina di Dulbecco (PBS; *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*), staccate con soluzione tripsina/EDTA allo 0.05% (*Lonza, Verviers, Belgio*) e usate nell'esperimento o ripiastrate in piatti di coltura di 75 cm<sup>2</sup>.

Come descritto dalla Società Internazionale di Terapia Cellulare [9], le cellule erano aderenti alla plastica, positive per CD105, CD73, CD90, negative per CD34, CD45 e in grado di differenziare in osteoblasti, adipociti e condrociti.

### **2. Preparazione dei dischi in titanio**

Sono stati usati dischi del commercio in titanio puro di grado 4, con un diametro di 6mm ed un'altezza di 2.5mm. Le superfici sono state trattate in tre diversi modi: 1) macchinata (M); 2) sabbiata con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a grana 100; 3) trattata al laser con pori di 20 µm di diametro ed altezza di 30 µm (L). (fig. 3a-b-c)

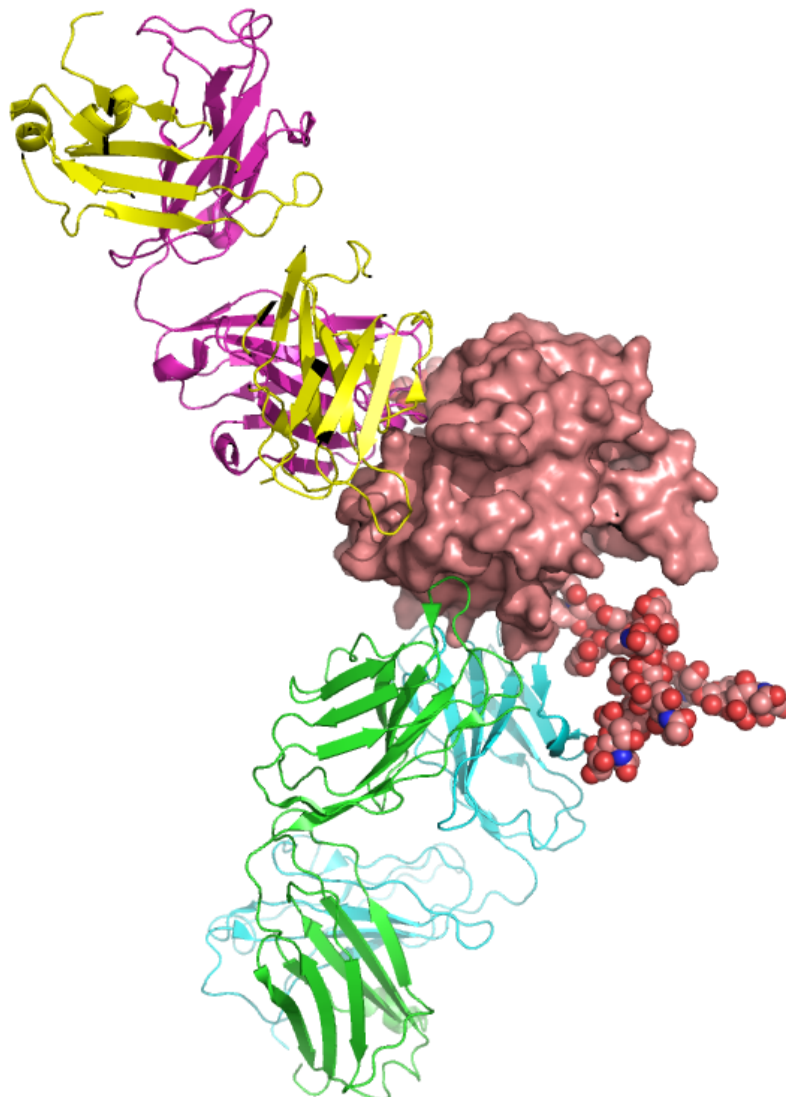
Dopo il trattamento di superficie il campione è stato lavato con una soluzione surfactante al 3%, risciacquato con acqua ultrapura ed infine sterilizzato con radiazioni-β. Il sistema laser utilizzato per il trattamento dei dischi comprende una fonte di luce laser, una testa di scansione ed un supporto per il disco assemblato in modo da mantenere, posizionare e muovere il dispositivo durante la processazione. Il generatore laser è un DPSS (Diode Pumped Solid State) lavorante in regime Q-switching (nanosecond pulses duration). Questo laser permette la formazione, durante il movimento dello scanner, di una sequenza di pori, attraverso la sincronizzazione appropriata della velocità e della frequenza di pulsazione.

### 3. Coltura delle cellule staminali sui dischi in titanio e differenziazione osteogenetica

I dischi in titanio sono stati posizionati sul fondo di 24 piastre e le hMSCs sono state messe in coltura con densità di 10000 cellule/cm<sup>2</sup> in LG-DMEM addizionato con 10% FBS. Per valutare la capacità adesiva e differenziativa sulle diverse superfici, sono state scelte tre tipologie di trattamento di superficie del titanio: superficie macchinata, superficie sabbiata e superficie modificata al laser.

Per indurre la differenziazione osteogenetica, le hMSCs sono state coltivate in un terreno inducente, consistente in un

addizionato con  
quale sono stati  
d i  
10 mM β-  
0.05 mM acido  
fosfato (*Sigma-  
Louis, MO*)  
Le cellule  
inserite nel  
D M E M  
10% FBS, senza  
inducente, sono  
come gruppo



L G - D M E M  
10% FBS, al  
aggiunti 100nM  
desametasione,  
glicerolfosfato e  
ascorbico 2-  
*Aldrich, st.*  
(gruppo test).  
s t a m i n a l i  
terreno LG-  
addizionato con  
alcun fattore  
state usate  
controllo.

### 4. Colorazione valutazione

L a

con Alizarina e  
quantitativa  
differenziazione

in senso osteogenetica è stata valutata con colorazione mediante Rosso di Alizarina S al 28°, 38°, 42°, 49°, 56° e 63° giorno dall'induzione. Il colorante si lega agli ioni calcio presenti all'interno della matrice mineralizzata, conferendo alla stessa un colore rosso brillante.

Le cellule sulla superficie in titanio sono state risciacquate con PBS e fissate con paraformaldeide 4% per 10 minuti. In seguito le cellule sono state lavate con acqua bidistillata ed incubate in una soluzione contenente Rosso di Alizarina S (*Sigma-Aldrich, st. Louis, MO*) e 1% idrossido di ammonio per 30 minuti a temperatura ambiente, sotto agitazione. Dopo l'incubazione, i dischi in titanio sono stati lavati due volte con acqua bidistillata, asciugate con aria e fotografati.

Per la valutazione quantitativa della differenziazione osteogenetica, la colorazione è stata quantificata con uno spettrofotometro ( $A_{405}$ ) dopo solubilizzazione con sodio dodecil-fosfato in 0.5M HCl [10].

## **RISULTATI**

Al 28° giorno abbiamo iniziato la valutazione quantitativa attraverso l'eluizione del Rosso di Alizarina presente sia sui dischi in titanio inseriti nel terreno osteogenetico, sia dei dischi nel terreno privo di fattori inducenti. I risultati dei valori di assorbanza del gruppo controllo sono esposti nella tabella I, mentre i valori di assorbanza del gruppo test sono enunciati nella tabella II.

Possiamo osservare come i valori di colorazione con Rosso di Alizarina dei dischi del gruppo controllo siano tutti inferiori a 0.1, per ogni superficie, sia dopo 28 giorni che dopo 38 e 42 giorni.

Nella tabella II, le cellule coltivate nel terreno addizionato con 100nM di desametasione, 10 mM  $\beta$ -glicerolfosfato e 0.05 mM acido ascorbico 2-fosfato mostrano valori di assorbanza decisamente superiori, dimostrando un buon grado di differenziazione.

La progressione della differenziazione è stata quindi studiata per tutte le superfici ed i valori sono riportati in tabella III. Abbiamo osservato che il comportamento delle cellule era simile per tutte e tre le superfici (figura 4): si verificava un incremento della differenziazione durante il primo periodo (fino alla sesta o settima settimana) e quindi un veloce decremento della differenziazione (fino alla nona settimana) dopo il picco. La superficie modificata al laser mostrava il suo picco differenziativo dopo 42 giorni (figura 5), mentre le superfici macchinata e sabbiata mostravano il picco differenziativo dopo 49 giorni (figure 6 e 7). Inoltre la caduta dei valori di assorbanza per la superficie modificata al laser era più lenta della caduta dei valori di assorbanza sulle altre due superfici (figura 8).

I valori per la superficie macchinata tendevano allo 0, mentre sia la superficie modificata al laser che la superficie sabbiata tendevano a stabilizzarsi intorno ad un plateau corrispondente al valore 0.4.

## **DISCUSSIONE**

Nel nostro dipartimento di Neuroscienze abbiamo provato a riprodurre in vitro le prime fasi dell'osteointegrazione artificialmente, verificando il grado di differenziazione delle cellule staminali.

Le sostanze additive per la determinazione del terreno osteogenetico sono state scelte in accordo con il protocollo di Pittenger *et Al.*, che nel 1999 ha esaminato le potenzialità differenziative delle cellule staminali mesenchimali umane, definendo il preciso terreno di coltura in grado di indurre la differenziazione osteogenetica in vitro. [11] Gli Autori hanno identificato nel desametasone, nel  $\beta$ -glicerolfosfato e nell'ascorbato gli elementi con la capacità di indurre la differenziazione delle hMSCs in osteoblasti, invece che in condroblasti o adipociti.

Il Titanio è ad oggi considerato il materiale metallico maggiormente biocompatibile. Recentemente, nel 2006 e nel 2009, due studi, condotti rispettivamente da Stiehler *et Al.* e Myllymaa *et Al.*, hanno esaminato l'influenza di diversi metalli sulle capacità adesive, proliferative e differenziative delle cellule staminali. [12, 13] In particolare, gli Autori hanno focalizzato l'attenzione sul Tantalio e sul Cromo, paragonando i risultati ottenuti al Titanio, ma sono arrivati alla conclusione che nessun altro materiale possiede la medesima affinità con le cellule staminali rispetto a quest'ultimo. I risultati in termini di differenziazione, infatti, ne confermano la biocompatibilità.

Abbiamo deciso di iniziare la nostra analisi dal 28° giorno dal momento che la colorazione della matrice mineralizzata con Rosso di Alizarina diventa ben apprezzabile dopo 3-4 settimane ed, inoltre, il nostro scopo era di analizzare la differenziazione delle cellule, e non la proliferazione. Abbiamo deciso di non analizzare l'attività enzimatica della Fosfatasi-alcalina perché questo rappresenta un indicatore precoce, mentre noi eravamo interessati all'analisi della differenziazione nel lungo periodo.

Abbiamo valutato la differenziazione alla fine di ogni settimana, iniziando dalla quarta, ma alla fine della quinta settimana abbiamo avuto un problema tecnico che ha causato la chiusura del Dipartimento e per tale motivo l'analisi è stata ritardata di 3 giorni (38° giorno invece che 35°).

La superficie modificata al laser e la sabbiata, poste all'interno di un terreno osteogenetico, mostravano un elevato grado di differenziazione, paragonato alla superficie macchinata, come mostrato dalle curve nella figura 8. Questo significa che la modificazione delle superfici implantari



ha una grande influenza sull'adesione e la differenziazione delle cellule staminali e, conseguentemente, sullo sviluppo della stabilità secondaria [14 - 17]. Il picco della curva blu, rappresentante la superficie modificata al laser, è al 42° giorno, una settimana prima dei picchi per le altre due superfici, e questo può essere interpretato come un'affinità migliore tra gli osteoblasti ed i pori prodotti dal trattamento laser della superficie in titanio.

Il rapido decremento della differenziazione osservato per tutte le superfici dopo il picco è stato attribuito dai biologi al grande grado di proliferazione nei confronti delle dimensioni relativamente piccole dei piatti convenzionali. Per questa ragione, le cellule (che non erano tumorali, ma sane) reagiscono alla troppo elevata densità con un'inibizione da contatto, che causa il distacco delle stesse l'una dall'altra e dal titanio.

## **CONCLUSIONI**

Prima di affermare qualsiasi conclusione, è necessario ricordare che questo studio è un lavoro preliminare *in vitro*, senza alcun significato statistico, volto all'analisi del comportamento delle cellule staminali su una superficie in titanio con caratteristiche particolari, data l'assenza in letteratura di dati in tal senso.

I dati ottenuti, che potrebbero essere anche dovuti al caso da un punto di vista statistico, ci danno delle indicazioni, che solo attraverso l'ampliamento del campione e la misurazione di un valore medio e di una deviazione standard, potranno essere confermati ed analizzati a fondo.

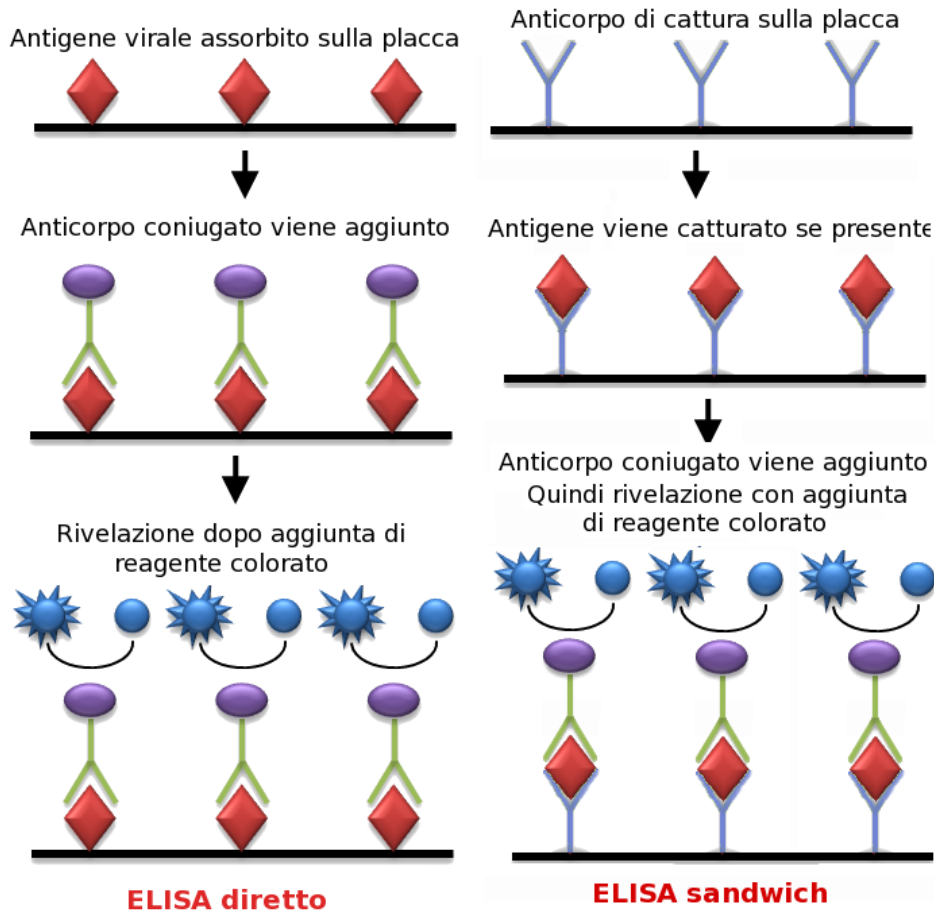
In risposta al primo obiettivo proposto, possiamo affermare che il Titanio da solo non può essere considerato un fattore induttivo sufficiente a causare la differenziazione in senso osteogenetico delle cellule staminali mesenchimali umane.

In secondo luogo, la modificazione al laser del titanio potrebbe aumentare la velocità di differenziazione delle cellule staminali, rispetto al trattamento macchinato o sabbiato. Questo può essere tradotto, da un punto di vista clinico, con una riduzione del periodo della flessione della stabilità e, quindi, minori possibilità di fallimento implantare.

Ciò è anche confermato dalla diminuzione della differenziazione, che è più lenta nella superficie modificata al laser, dove tende ad un plateau intorno a 0.4. Questa reazione può essere interpretata come una migliore affinità di legame tra gli osteoblasti ed il titanio trattato, in confronto allo stesso tipo di connessione con la superficie sabbiata e macchinata.

Studi futuri, già iniziati dalla nostra equipe, sono volti alla conferma di questi dati con un campione più grande di dischi in titanio: per ogni time-point saranno analizzati più dischetti per ogni superficie in modo da misurare un valore medio e la deviazione standard. In seguito, gli Autori

intendono  
questi



verificare  
risultati

utilizzando

campioni

di cellule staminali prelevati da diversi individui: in questo modo si può verificare se cellule provenienti da diversi pazienti presentino lo stesso comportamento nelle differenti superfici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Vetter A, Epari DR, Seidel R, Schell H, Fratzl P, Duda GN, Weinkamer R. Temporal tissue patterns in bone healing of sheep. *J Orthop Res*. 2010 Nov;28(11):1440-7.
2. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997 Sep;12(9):1335-47.
3. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976;47:327-59.
4. Raghavendra S, Wood MC, Taylor TD. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 May-Jun;20(3):425-31.
5. Fox CF, Skalak R, eds. *Tissue Engineering*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1988 (1st Tissue Engineering Symposium Proceedings Book).
6. Ingber DE, Mow VC, Butler D, Niklason L, Huard J, Mao J, Yannas I, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. *Tissue Engineering and Developmental Biology: going Biomimetic*. *Tissue Eng*, 2006; 12(12):3265-83.
7. Amizuka N. Bone quality in the respect of bone matrix. *Clin Calcium* 2004, 14:589-93.
8. Marks SC, Jr. Hermey DC. The structure and development of bone; in: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Eds. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, 2001; 3-14.
9. Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab*, 2005; 21:193-7.
10. Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* 2005, Mar 22.
11. Owen MJ, Karsenty G. New developments in bone formation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998, 7:18-27.
12. Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N, Hufner M. Differential regulation of Cbfa1/runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin D3, dexamethasone and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem*, 2002; 86:348-56.
13. Tou L, Quibria N, Alexander JM. Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by morphogenetic protein 7. *Mol Cell Endocrinol*, 2003; 205:121-9.
14. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002, 1:17-29.

15. Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Yoshida N, Yamaguchi A. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone*, 2004; 34: 993-1003.
16. Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Munoz J, Spees JL, Prockop DJ. How Wnt signalling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Ann NY Acad Sci* 2005, 1049:97-106.
17. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL, Williams BO. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem*, 2005; 280(22):2162-68.
18. Mbalaviele G, Sheikh S, Staine JP, Salazar VS, Cheng SL, Chen D, Civitelli R. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *J Cell Biochem* 2005, 94(2):403-18.
19. Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JI, Baylink DJ. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78(5):3204-08.
20. Formigli L, Orlandini SZ, Benvenuti S, Masi L, Pinto A, Gattei V, Bernabei PA, Robey PG, Collin-Osdoboy P, Brandi ML. In vitro structural and functional relationships between preosteoclastic and bone endothelial cells: a juxtacrine model for migration and adhesion of osteoclast precursors. *J Cell Physiol* 1995, 162:199-204.
21. Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: a physiological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des* 2001, 7:613-35.
22. Takai H, Kanematsu M, Yano K. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1998, 273:27091-96.
23. Marotti G. Static and dynamic osteogenesis in the process of bone repair. *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia*, 2004; XXX (1):S1-S5.
24. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenic potential of fracture hematoma. *J Bone Joint Surg*, 1990;72:822-29.
25. Grundnes O, Reikeras O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 1993; 64:340-342.
26. Cawood JJ, Howell RA. A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988; 17:232-6

