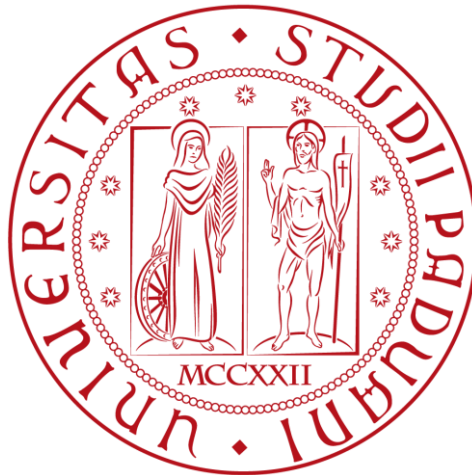


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA – FACOLTA' DI INGEGNERIA**

---

**LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**ANNO ACCADEMICO 2010/2011**



**SUPERFICI OSTEOCONDUTTIVE IN TITANIO NELL'IMPLANTOLOGIA  
ORALE**

**OSTEOINDUCTIVE TITANIUM SURFACES IN ORAL  
IMPLANTOLOGY**

Tesina di laurea triennale

**Laureanda:**

Annarita Signoriello

**Relatore:**

Prof. Andrea Bagno

---



# INDICE

<b>ABSTRACT</b>	<b>pag. 4</b>
<b>1. L'IMPLANTOLOGIA ORALE</b>	<b>pag. 5</b>
1.1 ANATOMIA DEL DENTE	pag. 5
1.1.1 I tessuti del dente	pag. 6
1.1.2 Il parodonto	pag. 7
1.2 L'IMPLANTOLOGIA	pag.8
1.2.1 La classificazione degli impianti	pag. 9
1.2.2 Successo e durata degli impianti	pag. 10
<b>2. L'OSTEOINTEGRAZIONE</b>	<b>pag. 13</b>
2.1 IL TESSUTO OSSEO	pag. 13
2.2 L'OSTEOINTEGRAZIONE IN AMBITO IMPLANTARE	pag. 14
2.2.1 L'origine del concetto e l'innovazione della scuola svedese di Brånemark	pag. 14
2.2.2 Descrizione del processo osteointegrativo	pag. 16
<b>3. IL TITANIO COME MATERIALE DI ELEZIONE NELLE APPLICAZIONI IMPLANTARI</b>	<b>pag. 18</b>
3.1 LE PROPRIETA' DEL TITANIO E SUE LEGHE	pag. 18
3.2 VITI PER IMPIANTI IN TITANIO	pag. 21
3.2.1 Confronto tra titanio e materiali ceramici	pag. 22
<b>4. LE SUPERFICI DEGLI IMPIANTI IN TITANIO</b>	<b>pag. 23</b>
4.1 INFLUENZA DELLA RUGOSITA' E DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA SULLA CONFIGURAZIONE DELLE SUPERFICI IMPLANTARI	pag. 23
4.1.1 Classificazione dei parametri di rugosità	pag. 28
4.2 UN CODICE STANDARD DI CLASSIFICAZIONE PER LE SUPERFICI IMPLANTARI	pag. 30

<b>5. TRATTAMENTI SUPERFICIALI PER SUPERFICI IMPLANTARI</b>	<b>pag. 37</b>
5.1 PANORAMICA SULLE TIPOLOGIE DI TRATTAMENTI	pag. 37
5.2 TRATTAMENTI FISICI DI TIPO MECCANICO	pag. 38
5.2.1 Superfici <i>machined</i>	pag. 38
5.2.2 Superfici sabbiate	pag. 39
5.3 TRATTAMENTI CHIMICI	pag. 41
5.3.1 Attacco con acido e attacco alcalino	pag. 41
5.4 SUPERFICI SLA	pag. 43
5.5 TRATTAMENTI ELETTROCHIMICI	pag. 44
5.5.1 Anodizzazione elettrochimica	pag. 45
5.5.2 Superfici nanoporose anodizzate	pag. 46
5.6 METODI DI DEPOSIZIONE SUPERFICIALE E RIVESTIMENTI	pag. 47
5.6.1 Il <i>titanium-plasma-spray</i>	pag. 47
5.6.2 Rivestimenti con fosfati di calcio	pag. 48
5.7 TECNICHE DI MODIFICAZIONE BIOCHIMICA	pag. 49
5.8 COMPORTAMENTO DELLE CELLULE SAOS-2 SIMIL-OSTEOBLASTICHE SU DIVERSE SUPERFICI IN TITANIO: PROLIFERAZIONE, ADESIONE E DIFFERENZIAZIONE CELLULARI	pag. 51
5.9 LE SUPERFICI NANOSTRUTTURATE	pag. 53
5.10 LA TECNOLOGIA MICROARRAY	pag. 55
5.11 LE SUPERFICI DIFFERENZIATE	pag. 56
5.12 IL PROBLEMA DELLA DECONTAMINAZIONE BATTERICA	pag. 57
5.12.1 Uso in vitro del laser ERL	pag. 58
5.12.2 Sterilizzazione di impianti con radiazioni UV a bassa intensità	pag. 59
5.12.3 Il plasma freddo di Argon	pag. 61
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>pag. 62</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 64</b>

## ABSTRACT

Il seguente lavoro prende in considerazione i complessi aspetti dell'osteointegrazione e dell'osteokonduzione su superfici implantari in titanio. Nel campo dell'implantologia il titanio risulta attualmente il materiale più utilizzato in virtù della sua eccellente biocompatibilità, requisito indispensabile per la perfetta riuscita di un innesto dentale.

Dopo una breve premessa sul processo osteointegrativo, la cui definizione risulta legata alla scuola svedese di Brånemark, e la descrizione dei caratteri distintivi delle viti in titanio, si affronta la caratterizzazione di una superficie implantare, con particolare attenzione ai concetti di rugosità e chimica superficiali, i quali influiscono profondamente sulla progettazione di determinate morfologie e configurazioni. Si passa in seguito alla proposta di un *codice standard* di classificazione per impianti, tenendo presente che gli studi e le indagini sui parametri e sulle caratteristiche di una superficie, e i legami fra di essi, sono ancora in corso. Si potranno in futuro apporre delle modifiche, con lo scopo di fornire un quadro più dettagliato dei fenomeni che avvengono all'interfaccia tra osso ed impianto e che coinvolgono in particolar modo l'adesione, il differenziamento e la proliferazione degli osteoblasti.

L'ultimo capitolo prende in analisi i trattamenti superficiali più importanti e diffusi a livello industriale, molti dei quali si dimostrano effettivamente validi nel rendere un substrato maggiormente osteoconduttivo, e dunque nell'avviare con successo l'osteogenesi e la guarigione dei tessuti perimplantari. Verranno inoltre approfonditi alcuni aspetti riguardanti superfici innovative di più recente concezione e tecniche di decontaminazione post-lavorazione.

# 1. L'IMPLANTOLOGIA ORALE

## 1.1 ANATOMIA DEL DENTE

I denti sono piccoli organi adibiti alla masticazione. In un dente osservato in sezione (Fig. 1.1) sono individuabili quattro tipi di tessuti, due superficiali, lo smalto ed il cemento, e due profondi, la dentina e la polpa [1]. Lo smalto riveste la parte visibile e sporgente dalla gengiva del dente, ovvero la *corona*, mentre il cemento la parte non visibile e di forma appuntita, cioè la *radice*, contenuta negli alveoli dentali (cavità dell'osso mascellare); inoltre, entrambi sono sottesi dalla dentina. Si individua poi la polpa, contenuta in una cavità centrale che si estende dalla corona alla radice e che comunica con il parodonto (a livello di radice) tramite un *foro apicale*. Il confine tra corona e radice è costituito dal *colletto*.

Dal punto di vista funzionale ed embriologico il dente va considerato insieme ai tessuti di sostegno: quindi smalto, dentina e polpa risultano veri e propri tessuti del dente, al contrario di cemento, legamento periodontale e gengiva, che sostengono invece il parodonto (i tessuti parodontali presentano caratteristiche strutturali proprie).

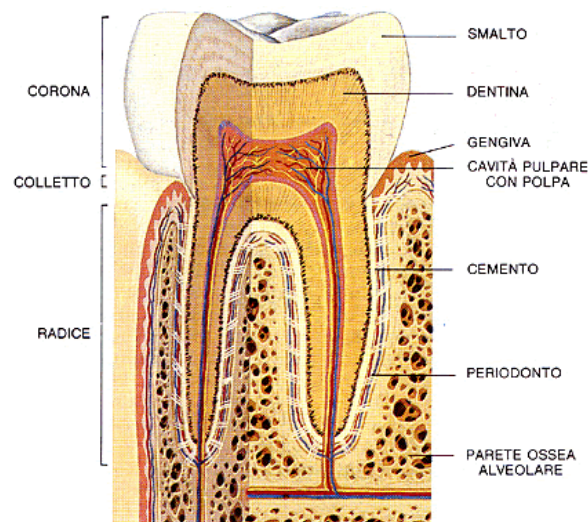
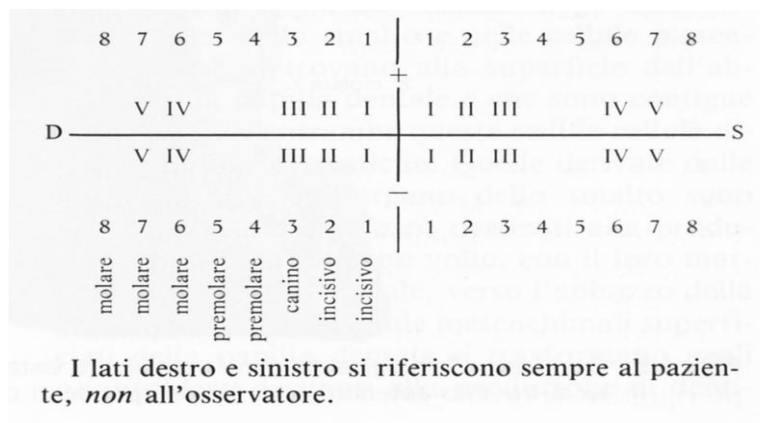


Figura 1.1 : Anatomia di un dente.

Nell'adulto, considerando l'avvenuta eruzione dei denti del giudizio, i denti sono in tutto 32, 16 per arcata: quelli dell'arcata mascellare sono detti superiori, quelli dell'arcata mandibolare inferiori. Ulteriore distinzione è quella fra denti di destra (superiori e inferiori) e di sinistra (superiori e inferiori). Per ogni metà dell'arcata ci sono 8 denti ordinati secondo la seguente successione: 2 incisivi, 1 canino, 2 premolari e 3 molari. Incisivi e canini formano i denti frontali, premolari e molari quelli laterali. La dentatura *definitiva*, che si raggiunge solitamente al 17°-21°

anno (nell'arco di tempo che va dai 6 ai 12 anni si forma la dentatura mista) e dà un assetto definitivo all'occlusione, è preceduta da quella *decidua*, costituita da 20 denti. Nella cosiddetta *formula dentale* (Fig. 1.2) i denti decidui sono numerati con numeri romani, quelli definitivi con numeri arabi, i superiori con segno + e gli inferiori col - :



**Figura 1.2:** Formula dentale.

La morfologia e la disposizione su arcate dentarie rispondono all'esigenza funzionale di mantenere stabile il dente e di proteggerlo dalle strutture esterne. Per esempio, se i molari avessero forma cuspidata, le forze di masticazione agirebbero in un verso tale da provocare compressioni dannose [1].

### 1.1.1 I tessuti del dente

Lo *smalto* è un tessuto di origine epiteliale privo di vasi e terminazioni nervose; è acellulare e si consuma con l'età (gli *ameloblasti*, una volta completata la produzione dello smalto, si atrofizzano); è inoltre molto duro (è il più duro nel corpo umano) a causa dell'elevata mineralizzazione; esso è composto per il 96 % di materiale inorganico, formato in gran parte da cristalli di idrossiapatite organizzati in prismi di smalto, e per il 3-4 % di acqua.

La *dentina*, separata dallo smalto tramite una linea ondulata e irregolare (la giunzione smalto-dentina) è un tessuto avascolare (fibre collagene) mineralizzato che circonda la cavità pulpare: sottende lo smalto a livello di corona ed il cemento a livello di radice. È un tessuto più duro dell'osso compatto, con sostanza intercellulare la cui componente prevalente è inorganica. La formazione della dentina è preceduta dalla deposizione e successiva mineralizzazione della *predentina*, sostanza non calcificata e perennemente presente nel dente in modo tale che la produzione della dentina risulti continua.

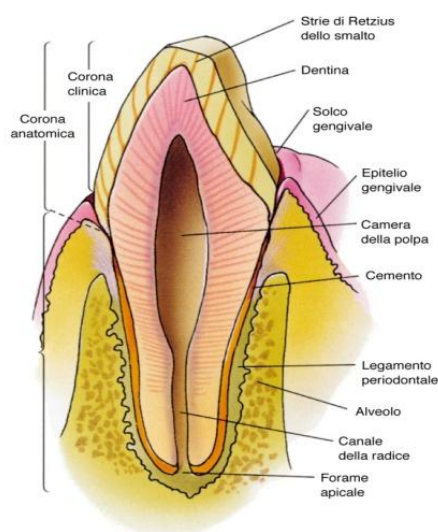
La *polpa* è l'unico tessuto connettivo lasso, altamente vascolarizzato e innervato, contenuto nella *cavità pulpare* della corona e dei canali radicolari. Si differenzia rispetto agli altri tessuti connettivi per la presenza degli *odontoblasti* (le cellule della dentina adibite alla produzione della sostanza intercellulare); in essa è inoltre contenuta la *polpa dentaria*, ricca di collagene.

### 1.1.2 Il parodonto

Il cemento ed il tessuto osseo alveolare (tessuti duri), il legamento periodontale e la gengiva (tessuti molli) costituiscono il *parodonto*, che concorre alla stabilità del dente nell'arcata alveolare. Il *cemento* è un tessuto calcificato di copertura alla radice e non va erroneamente considerato come un tipo di tessuto osseo poiché avascolare.

La *gengiva* è una mucosa che circonda il colletto e riveste i processi alveolari, insinuandosi tra i singoli denti a formare la papilla gengivale; verso l'apice del dente si trova poi la *mucosa alveolare*, ben distinguibile dalla gengiva fissa per il colorito rosso più intenso.

Il *legamento periodontale* (Fig. 1.3) occupa lo spazio periodontale tra la superficie radicolare e la parete della cavità alveolare, confinando in alto con la gengiva e in basso con la polpa. La sua funzione è quella di legare le proprie fibre collagene (in fasci) al cemento e all'osso alveolare; tali fibre presentano anche vasi e nervi, risultano quindi sensibili alle sollecitazioni pressorie, dalle quali il legamento provvede a proteggere adeguatamente il dente. In questo tessuto ci sono molte cellule diverse, come cementoblasti, osteoblasti, fibroblasti.



**Figura 1.3:** Sezione longitudinale di un dente incisivo inferiore.



## 1.2 L'IMPLANTOLOGIA

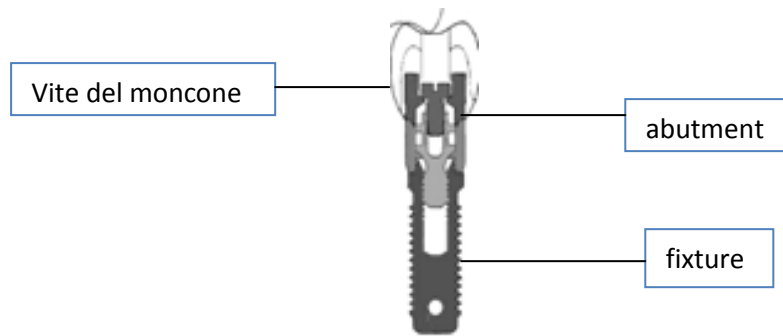
I tentativi sperimentali di sostituzione di denti mancanti e dei loro tessuti di appoggio (osseo e gengivale) mediante impianti artificiali sono stati condotti fin dall'antichità, ma soltanto verso la metà del Novecento, specialmente negli ultimi tre decenni, è stato compiuto il passo verso il raggiungimento di un'implantologia odontoiatrica basata su precisi fondamenti scientifici. Negli anni '80 l'implantologia è entrata a far parte della medicina odontostomatologica, e non è più stata considerata una disciplina specialistica a sé stante.

Precedenti agli impianti sono gli utilizzi di protesi mobili o fisse, che hanno però lo svantaggio di danneggiare i denti vicini. Oltre alla sostituzione di una singola radice, un impianto può servire per mantenere ancorate dentiere instabili (l'uso delle protesi mobili è rimasto valido in questo senso). L'implantologia si pone come settore di collegamento tra la chirurgia e la protesi: essa non rispetta l'*integrità ectodermica* [2], cioè la continuità del rivestimento epiteliale ininterrotto a livello delle superficie corporea, in quanto introduce direttamente materiali alloplastici in ambiente biologico. Poiché persino con gli autotrapianti l'integrazione non risulta così immediata, l'introduzione di un corpo estraneo è un fenomeno delicato che presuppone un'elevata capacità rigenerativa da parte dei tessuti dell'organismo.

Gli impianti non sono inseriti completamente nei tessuti (impianti *chiusi*), come avverrebbe per esempio con una valvola cardiaca, ma sono *aperti* (Fig. 1.5) ed interrompono la superficie epiteliale. Gli impianti chiusi sono di raro uso: in essi il rivestimento epiteliale viene sospeso in occasione dell'inserimento e ripristinato dopo l'intervento mediante suture.

L'applicazione di un impianto risulta positiva se nel paziente si trova tessuto osseo a sufficienza, mucosa aderente estesa ed epitelio sottile. Nella pratica chirurgica l'intera operazione comprende due fasi distanti fra loro nel tempo dai tre ai sei mesi, per consentire un'osteointegrazione di successo.

In un impianto vi sono tre componenti [3] (Fig. 1.4) : il corpo dell'impianto (*fixture*), il moncone (*abutment*) e la vite del moncone. La parte sporgente sulla cavità orale è l'esostruttura (sulla quale verrà posta la sovrastruttura), la parte immersa l'endostruttura [2].



**Figura 1.4:** Complesso impianto-protetico.



**Figura 1.5:** Rappresentazione schematica di un impianto.

### 1.2.1 La classificazione degli impianti

Gli impianti possono essere distinti in cinque tipologie (Fig. 1.6) [2]:

- *Impianti sottoperiostali*: una struttura metallica viene posta chirurgicamente tra la superficie ossea e il periostio, quindi subito sopra l'osso; i pilastri dell'impianto trapassano in alcuni punti la mucosa che lo ricopre. Questi impianti vengono raramente usati, data la forma poco simile alle radici naturali, quindi meno riprodotto il giusto stimolo all'osteointegrazione, e presentano percentuali alte di insuccesso.

- *Impianti endossei*: l'impianto è inserito nell'osso in modo diretto; mentre quelli chiusi, posti sotto il periostio, non possono comunicare con la cavità orale, quelli aperti sono dotati di un pilastro avente tale funzione; la maggior parte degli impianti endossei è proprio di quest'ultimo tipo; c'è un sottotipo di impianto endosseo destinato a rimanere al di sotto di uno strato epiteliale integro per parecchi mesi (fase di cicatrizzazione) e che viene esposto all'esterno soltanto in un secondo tempo. Sono gli impianti relativamente più diffusi, per la maggiore semplicità delle tecniche chirurgiche e per la possibilità di applicare un nuovo impianto nel caso di fallimento.

- *Impianti endossei sottoperiostali*: sono una combinazione tra le due tipologie precedenti (una parte è sopra l'osso, una parte è dentro di esso).

- *Impianti transossei*: sono specifici della mandibola e la attraversano verticalmente.

- *Impianti transdentali*: sono anche denominati *endodontici* in quanto stabilizzano i denti nei quali sono posti: è come se avessero una sorta di “collare biologico” per l’ancoraggio tra il sigillo di separazione con il cavo orale e il parodonto del dente naturale.

- *Impianti intramucosi*: sono inseriti nella mucosa di rivestimento tramite fissazione ad una base protesica; poiché non perforano l’epitelio di rivestimento e non rimangono permanentemente nella sede dell’impianto, risultano più adatti a rientrare nell’ambito protesico classico piuttosto che in quello implantare.

Un’altra suddivisione, in quattro classi, prende in considerazione la sede dell’impianto, andando dal caso della perdita di un singolo dente all’edentulia completa (si potranno quindi applicare, a seconda dell’esigenza, corone, ponti o *overdenture*).



**Figura 1.6:** Diversi tipi di impianti. A partire da sinistra, endossei a forma di radice, un sottoperiostale e un transosseo.

### 1.2.2 Successo e durata degli impianti

Studi sempre più approfonditi hanno permesso di poter evitare il più possibile il rigetto degli impianti, fenomeno che avveniva in passato, viste le conoscenze ancora carenti in ambito osteointegrativo: si è oggi passati ad impianti con la capacità di integrarsi interamente nel tessuto naturale. La prognosi a lungo termine viene determinata dalle caratteristiche biologiche e biomeccaniche dell’osso, oltre che dall’altezza numerica dell’osso che circonda l’impianto.

Il *successo* di un impianto può essere decretato in seguito al soddisfacimento di determinate condizioni [2]:

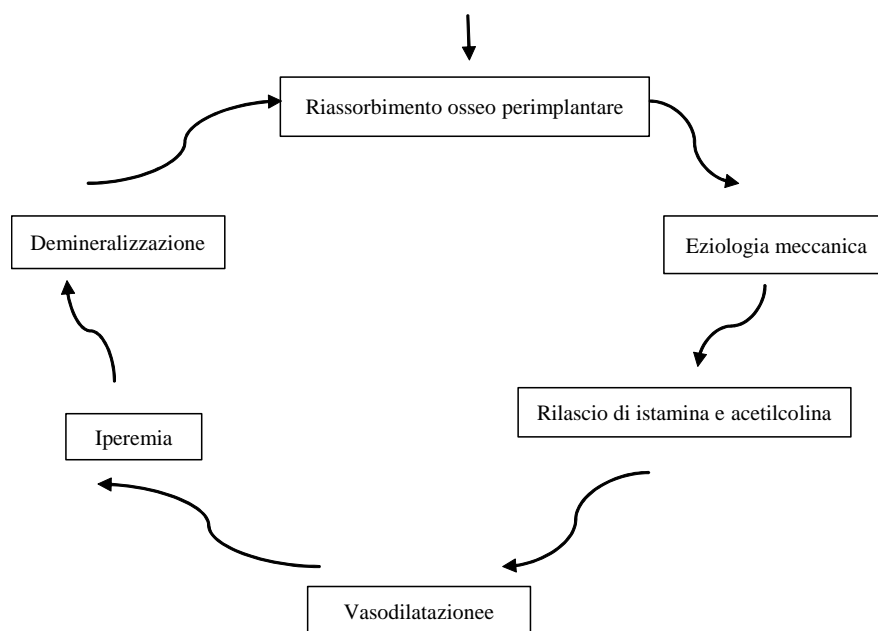
- le funzioni fonetica, estetica e masticatoria migliorano;
- l’impianto sotto carico risulta funzionale per almeno cinque anni, ossia non provoca dolore ed è clinicamente stabile;
- il parodonto è clinicamente stabile e non sanguina;
- non si riscontra, dal punto di vista radiologico, nessun aumento della distruzione ossea; la perdita di osso non comprende ovviamente l’atrofia fisiologica che si può verificare come in tutte le protesi convenzionali;

- non si ha radiotrasparenza (limitata capacità di attenuazione dei raggi X);
- le salute del paziente non viene alterata.

I fattori di *insuccesso* [2] in campo implantare non presentano differenze tra i due sessi e, al contrario di quello che si potrebbe pensare, non sono così strettamente correlati all'età:

- sede errata per l'impianto, senza osservare le dovute controindicazioni;
- scelta non appropriata del tipo di impianto, per quello che concerne la forma e il materiale;
- inserimento non buono (tecnica chirurgica sbagliata), con conseguenze intraoperatorie e post-operatorie;
- mancata immobilizzazione o infezione dopo l'operazione;
- carico eccessivo oppure carico insufficiente, entrambi non favorevoli all'osteointegrazione;
- quantità o qualità ossea (es. osteoporosi) non appropriate;
- complicanze di salute nel paziente e scarsa igiene orale.

I *sintomi* principali che compaiono in conseguenza al fallimento di un impianto sono: mobilità (già durante il primo anno), formazione di *tasche* e infezione (le tasche accolgono infatti la carica batterica), dolore da compressione, distruzione dell'osso, osteite, disturbi della sensibilità, parti di impianto scoperte, sinusite mascellare [2]. Più l'impianto è mobile, più profonde sono le tasche che si formano e più aggressiva risulta dunque la reazione infiammatoria. Si viene a creare una sorta di "circolo vizioso" tra mobilità, demineralizzazione e riassorbimento osseo (Fig. 1.7):



**Figura 1.7** : Circolo vizioso tra mobilità dell'impianto e riassorbimento osseo (secondo Spiekermann, 1977).

L'insuccesso *immediato* è legato alla distruzione rapida del contatto tra osso e innesto, tale da creare subito la mobilità dell'impianto; quello *tardivo* è legato all'avanzare del riassorbimento osseo, alla profondità dell'inserimento nell'osso, all'inadeguatezza del tessuto o della superficie di partenza, e provoca mobilità solo dopo alcuni anni. In una situazione ideale, non si dovrebbe verificare né mobilità immediata, né tardiva, ed è auspicabile una prevenzione da infezioni dell'ambiente attorno all'impianto (*periimplantiti*), che purtroppo si rivelano più frequenti negli impianti a superficie ruvida, maggiormente diffusi per le loro proprietà osteoconduttive.

## 2. L'OSTEOINTEGRAZIONE

### 2.1 IL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo che si identifica fisicamente per la combinazione tra sostanza inorganica e sostanza organica, unite a formare una sostanza *fondamentale* amorfa. I componenti della parte *organica* sono osseina e osteomucoide (una glicoproteina). Nella sostanza *inorganica*, che nell'adulto costituisce circa il 60-70% della massa totale ossea, si trovano fosfato di calcio (86%), carbonato di calcio (12%), fosfato di magnesio (1.5%), fluoruro di calcio (0.5%) e ossido di ferro (in tracce) [4]. Elasticità e resistenza alla trazione sono fornite dalla componente organica, rigidità e durezza da quella minerale (per l'importante presenza dell'*idrossiapatite*): tali caratteristiche rendono il tessuto ideale per funzioni strutturali e di sostegno. Dal punto di vista delle proprietà meccaniche, un aumento del contenuto minerale rende l'osso fragile e friabile, una diminuzione lo rende più tenero e deformabile.

Si possono presentare due tipi di struttura, *lamellare* e *non lamellare*, entrambi dotati di cellule ossee e di sostanza fondamentale, orientati però in maniera precisa solo nel primo tipo. La gran parte delle ossa del corpo umano sono costituite da tessuto lamellare: l'organizzazione è in più lamelle ossee, le quali hanno una parte organizzata in fibrille collagene parallele e con disposizione in strati concentrici sovrapposti; la parte libera è in sostanza amorfa, mentre una sostanza cementante ha lo scopo di saldare le lamelle fra loro. Il rimodellamento dell'osso a lamelle concentriche (a partire dalla pubertà), sia nell'osso compatto che in quello spugnoso, porta alla formazione di una struttura sempre lamellare ma discontinua, con frammenti incastrati fra loro e detti *osteoni* (un *canale di Havers* li percorre al centro). Le lamine ossee, costituite da lamelle sovrapposte, danno origine al tessuto *spugnoso*; il *compatto* si origina invece dall'unione di più lamelle e presenta dei canali non orientati con vasi o tessuto connettivo.

Per quanto riguarda l'*osso mascellare*, di particolare interesse per gli obiettivi di questo lavoro, è circondato esternamente dal periostio, al di sotto del quale si trova osso corticale compatto; internamente si ha invece osso spugnoso, il cui orientamento, al contrario del corticale, "varia al variare della funzione" [2].

Osteoblasti, osteociti e osteoclasti sono le cellule del tessuto osseo: mentre le prime due appartengono alla linea delle cellule osteoprogenitrici (mesenchimali), gli osteoclasti discendono dai preosteoclasti, imparentati coi monociti [5]. Le cellule *osteoprogenitrici* sono presenti

specialmente durante l'accrescimento (in misura minore nell'adulto), in quanto producono fattori di crescita e di differenziamento; dalla loro differenziazione hanno origine gli osteoblasti.

Gli *osteoblasti* si occupano della sintesi della sostanza intercellulare organica e prendono parte alla calcificazione (produzione di osteonectina e osteocalcina), essendo dotati di molti ribosomi e di un apparato di Golgi voluminoso; si appiattiscono sulle superfici ossee in via di sviluppo a formare lamine; partecipano al riassorbimento per via indiretta tramite stimolazione degli osteoclasti (produzione di TGF- $\beta$  e BMPs), per via diretta attraverso la secrezione di enzimi proteolitici come la collagenasi.

Gli *osteociti* costituiscono parte degli strati ossei depositati e concorrono al mantenimento dell'osso maturo, in quanto sono osteoblasti che hanno terminato il loro compito (sono pronti a ritrasformarsi in osteoblasti se le condizioni lo richiedono). Sono pure dotati di prolungamenti ramificati e disposti nelle lacune e nei canalicoli ossei, un sistema ramificato di cavità comunicanti dove avvengono gli scambi metabolici e gassosi [5].

Al riassorbimento osseo sono adibiti gli *osteoclasti*, di dimensioni più grandi rispetto agli altri due tipi di cellule, plurinucleati e ricchi di ribosomi e lisosomi; essi liberano infatti idrolasi acide per la dissociazione dei sali minerali e la distruzione delle fibre collagene; insieme ad osteoblasti ed osteociti contribuiscono allo scambio di calcio tra osso e sangue, oltre a prendere parte al rimodellamento osseo con gli osteoblasti; la loro azione viene regolata da paratormone e calcitonina (mantengono l'equilibrio della calcemia).

Nel tessuto osseo è necessario un continuo bilanciamento tra l'attività di deposizione e di riassorbimento, al fine di mantenere costante la massa ossea e di ottimizzare le prestazioni dal punto di vista del carico [5].

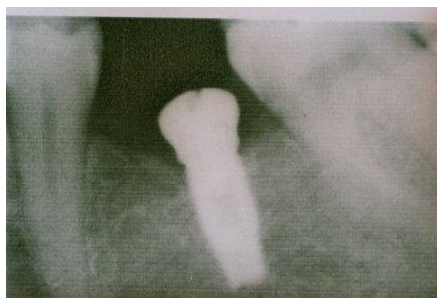
## **2.2 L'OSTEOINTEGRAZIONE IN AMBITO IMPLANTARE**

### **2.2.1 L'origine del concetto e l'innovazione della scuola svedese di Brånemark**

Il campo della riabilitazione di pazienti edentuli è stato arricchito dall'innovazione introdotta, a metà Novecento, da un professore svedese, Per-Ingvar Brånemark, il quale ha avuto il merito di elaborare una *metodica implantare* basata su criteri ben definiti e su previsioni affidabili. Alla scuola svedese si deve la nascita del concetto di *osteointegrazione*, definita come "l'unione strutturale e funzionale diretta fra osso vitale e superficie di un impianto sottoposto a carico" (Brånemark, 1985) [6]. Nei primi anni '60 è stata studiata la risposta dell'osso midollare ai traumi e

alle manovre clinico-chirurgiche: tre decenni di ricerca e di sviluppo, consistenti in studi clinici e laboratorio, hanno permesso di stabilire una tecnica implantologica “in grado di sostituire i denti naturali mancanti con elementi analoghi alle radici dentarie” [6]. La scoperta che ha portato alla definizione dell’osteointegrazione consistette in uno studio dell’osso mediante microscopia ottica in vivo: si incorporò una camera ottica metallica, in titanio, nella tibia di un coniglio. Dopo l’osservazione della rigenerazione conseguente a difetti ossei indotti, si andò a rimuovere la camera e si notò che essa si era “incorporata” nell’osso. Vi era inoltre una perfetta adesione tra il tessuto apposto e le irregolarità della superficie titanica. Gli esperimenti successivi portarono alla realizzazione di impianti dentali, le viti in titanio (Fig. 2.1), e si verificò che in esse non avveniva *osteofibrointegrazione* o riassorbimento osseo. Era palese l’affinità dell’osso nei confronti del titanio e dello strato di ossido che si forma sulla sua superficie, più che per altri metalli fino a prima utilizzati. Legami diversi, come le forze di van der Waals, i legami a idrogeno e i legami chimici locali, hanno la capacità di unire le biomolecole allo strato di  $TiO_2$  nel caso di appropriati trattamenti. Gli impianti osteointegrati, fin dalle prime indagini, mostrarono risultati promettenti anche in pazienti parzialmente o totalmente edentuli (Fig. 2.2), sebbene oggi la sperimentazione sui risultati a lungo termine non sia ancora terminata.

Per quanto concerne l’applicazione del carico, se l’impianto viene sottoposto ad uno stress precoce, si rischia di causarne la mobilità, provocando l’interposizione di uno strato fibroso periimplantare. L’apposizione di nuovo osso e la conseguente guarigione devono perciò avere dei tempi minimi di attesa, 4 mesi per la mandibola e 6 per la mascella (tempi definiti dallo stesso Brånemark). La metodica svedese ha definito un *modello di distribuzione dello stress* equilibrato e accettabile sotto il punto di vista biologico, favorendo una corretta spartizione dei carichi occlusali sull’osso che circonda il sito dell’innesto, onde evitare di fare pressione su zone non desiderate [6]. Anche i controlli regolari e un’adeguata igiene orale contribuiscono ad evitare il fallimento del processo osteointegrativo.



**Figura 2.1** : RX di un impianto cilindrico in titanio come radice dell’elemento mancante.



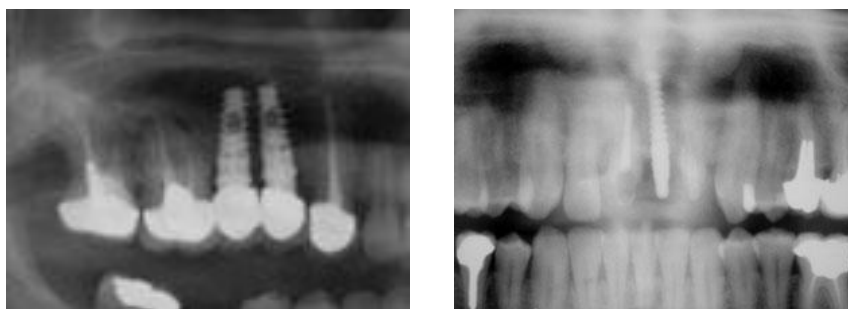


**Figura 2.2:** Protesi per edentulia.

### 2.2.2 Descrizione del processo osteointegrativo

Il processo di osteointegrazione su di una superficie implantare comprende delle fasi abbastanza complesse ed il coinvolgimento di molteplici fattori (tra i più importanti la microstruttura e la chimica superficiali), i quali influiscono sul risultato sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo.

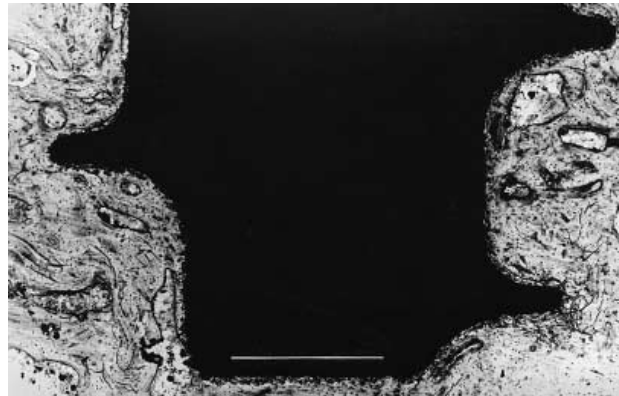
Gli studi di Osborn e Newesley [7] hanno mostrato che la neoformazione ossea avviene attraverso due fenomeni, l'osteogenesi *a distanza* e quella *da contatto*. Nel primo caso la deposizione da parte degli osteoblasti e la successiva mineralizzazione avviene in una direzione che va dalla periferia verso l'impianto, ossia l'osso va a circondare gradualmente la vite. Nel secondo processo si verifica un'osteointegrazione in direzione opposta, dall'impianto alla periferia. L'apposizione di nuovo osso esige un continuo richiamo di cellule dall'osso e dal circolo sanguigno verso l'impianto, dato che gli osteoblasti, dopo il differenziamento, sono solo in grado di produrre osso per apposizione. Una volta che essi si sono polarizzati, producono proteine ECM, specialmente collagene, con lo scopo di dare una struttura precisa all'interfaccia osso-impianto, che, dopo la calcificazione, si tramuta in matrice osteoide e infine in tessuto osseo (Fig. 2.3).



**Figura 2.3:** Radiografie che evidenziano avvenuta osteointegrazione degli impianti.

Perché l'osteointegrazione avvenga nel modo più corretto e soddisfacente possibile, si sono sviluppati diversi trattamenti superficiali, che consentono di irruvidire la topografia: si preferiscono superfici rugose alle lisce perché assorbono di più le biomolecole coinvolte nei processi sopra descritti, favoriscono di più la differenziazione degli osteoblasti, aumentano la sintesi di ECM e incrementano l'aggregazione delle piastrine [7].

Bisogna precisare l'osteointegrazione è legata anche ai concetti di *osteoiduzione* e *osteocostruzione* [8]. Con la prima definizione si indica la stimolazione delle cellule osteoprogenitrici alla differenziazione osteoblastica, fenomeno che dà avvio all'osteogenesi, quindi la "induce". L'osteocostruzione riguarda invece la crescita dell'osso su di una superficie, implica dunque l'esistenza di superfici più o meno osteoconduttive, ossia in grado di favorire meglio o peggio l'adesione e l'adattamento delle cellule al sito implantare. Si vede come l'ancoraggio diretto (l'osteointegrazione) tra impianto e nuovo osso, se si mantiene con successo e senza interposizione di tessuto fibroso (al contrario, l'*osteofibrointegrazione* comporta reazioni infiammatorie, riassorbimento osseo e fallimento dell'impianto), non sia altro che il risultato concreto di una precedente osteoiduzione e osteocostruzione (Fig. 2.4).



**Figura 2.4:** Vite osteointegrata rivestita in idrossiapatite.

### 3. IL TITANIO COME MATERIALE DI ELEZIONE NELLE APPLICAZIONI IMPLANTARI

#### 3.1 LE PROPRIETA' DEL TITANIO E SUE LEGHE

Le proprietà fisiche di un materiale metallico sono determinate dalla sua struttura cristallina e dal legame metallico. I metalli sono apprezzati dal punto di vista meccanico in quanto sono elastoplastici: hanno modulo elastico e carico di snervamento elevati, un'alta resistenza alla fatica e sono duttili [5]. Grazie a queste peculiarità sono in grado di resistere bene al carico e non si deformano quasi per niente dal punto di vista elastico e plastico (permanente).

Il metallo più biocompatibile è sicuramente il titanio. Si possono distinguere due forme allotropiche: la forma esagonale (struttura EC)  $\alpha$ -Ti è stabile non oltre 882°C, la forma cubica (struttura CCC)  $\beta$ -Ti è stabile a temperature superiori a 882°C; la prima si stabilizza in lega con l'alluminio, la seconda col vanadio [5]. Dalla forma  $\alpha$  a quella  $\beta$  aumenta la grandezza granulare media [2]. E' necessario precisare che le leghe hanno caratteristiche peggiori rispetto al titanio puro dal punto di vista della biocompatibilità, a causa del possibile rilascio di ioni alluminio e vanadio; risultano migliori invece dal punto di vista meccanico. Per questa ragione il titanio puro viene solitamente usato per innesti dentali, le leghe in campo ortopedico.

La lega di titanio più usata in campo biomedico è la Ti6Al4V, con il 6% di alluminio e il 4% di vanadio: è caratterizzata da un modulo di elasticità più basso rispetto alle leghe di cobalto, ma più alto rispetto al titanio puro (che rimane comunque più resistente alla corrosione rispetto alle leghe). Inoltre, più impurezze si aggiungono, maggiore è la resistenza e minore è la duttilità, con una grande variabilità che consente di scegliere il materiale adatto in base all'esigenza (Tabella 3.1).

	Titanio				Lega
	Qualità 1	Qualità 2	Qualità 3	Qualità 4	Ti6Al4V
Carico a rottura(MPa)	240	345	450	550	860
Carico di snervamento(MPa)	170	275	380	485	795
Allungamento a rottura(%)	24	20	18	15	10
Modulo elastico E(GPa)	103	103	103	105	114
Strizione a rottura(%)	30	30	30	25	25

**Tabella 3.1:** Proprietà meccaniche del titanio e della lega Ti6Al4V (da J.B. Park and R.S. Lakes: Biomaterials: an Introduction, 2nd edition Plenum Press, New York, 1992).

Le caratteristiche che rendono il titanio adatto alle applicazioni protesiche sono sicuramente: la leggerezza (è più leggero anche dell'acciaio ed ha una densità di  $4.5 \text{ g/cm}^3$ ), la scarsa tossicità, la bassa conduttività termica, l'elevata costante dielettrica, il basso peso specifico e il non essere ferromagnetico. Un vantaggio rispetto ad altri materiali è la migliore resistenza specifica, mentre la scarsa resistenza al taglio e la tendenza a grippare generano delle complicanze. E' inoltre molto reattivo, in particolare all'ossigeno che, penetrando al suo interno, lo rende fragile [5].

I materiali metallici usati nell'implantologia (caratteristiche in Tabella 3.2), come in altri ambiti medici, sono considerati avere un buon grado di biocompatibilità, anche se si deve porre attenzione al rischio della corrosione conseguente al contatto con i tessuti, problema che può essere limitato con specifiche procedure durante la lavorazione dei prodotti [5].

Prima del titanio si sono inizialmente sperimentate nell'implantologia le leghe dell'oro, ma con risultati non soddisfacenti, in conseguenza alla formazione di uno strato fibroso all'interfaccia osso-impianto che di certo non assicura il successo osteointegrativo; anche le leghe cobalto-cromo introdotte successivamente hanno dato lo stesso risultato.

Tollerabilità biologica: biotolleranza, bioinerzia, bioadesività, bioreattività, tossicità, anallergenicità, acancerogenicità
Resistenza alla corrosione
Resistenza alla rottura
Isoelasticità con il tessuto osseo
Resistenza all'abrasione
Sterilizzabilità
Contrasto radiografico positivo: controllo della posizione e del completo rigetto
Buone proprietà isolanti: cattiva conducibilità elettrica, elettroneutralità
Facile tecnica di applicazione

**Tabella 3.2:** Riassunto dei requisiti dei materiali implantari.

Ecco dunque che gli altri metalli sono stati progressivamente rimpiazzati dal titanio [9]. La funzione masticatoria è infatti ben in linea con un materiale così resistente.

Le qualità di titanio attualmente disponibili in commercio sono quattro: qualità 1, qualità 2, qualità 3, qualità 4 (Tabella 3.3) e differiscono per il diverso contenuto in azoto, carbonio, idrogeno, ferro e ossigeno.

elemento	Titanio				Lega
	Qualità 1	Qualità 2	Qualità 3	Qualità 4	Ti6Al4V
N	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05
C	0.10	0.10	0.10	0.10	0.08
H	0.015	0.015	0.015	0.015	0.0125
Fe	0.20	0.20	0.30	0.50	0.25
O	0.18	0.25	0.35	0.40	0.13
Ti	resto				

**Tabella 3.3:** Composizione chimica del titanio e delle lega Ti6Al4V (da J.B. Park and R.S. Lakes: Biomaterials: an Introduction, 2nd edition Plenum Press, New York, 1992).

Si precisa che è stata recentemente introdotta una quinta qualità di titanio, solitamente non usata per la fabbricazione degli impianti, per i quali si preferiscono invece le qualità 2 e 3: con queste qualità viene infatti raggiunto un compromesso tra buone proprietà meccaniche (alta percentuale di impurità) e buona osteointegrazione (bassa percentuale di impurità), anche se si tende a privilegiare il secondo obiettivo quando si ha a che fare con innesti dentali. Il contenuto di ossigeno è particolarmente importante per la duttilità e la resistenza del manufatto [5] (essa aumenta aggiungendo anche azoto e idrogeno, i quali contribuiscono contemporaneamente al diminuire della durezza).

Gli impianti in titanio presentano uno strato inerte di ossido, che si forma a contatto con l'aria, con l'acqua e che si riforma velocemente anche dopo un danneggiamento. Il  $TiO_2$  ha una funzione di protezione della superficie dalla corrosione ed è abbastanza sottile (spessore di 3-6 nm), non cristallino, con composizione irregolare, ottenuto con un processo di passivazione chimica di acidi inorganici, che permette di omogeneizzare la superficie e di aumentare il grado di rugosità a favore di un aumento della quantità di eventuali siti di attacco per le cellule e quindi di una buona osteointegrazione. Con il passare del tempo, lo strato può aumentare il suo spessore, soprattutto in prossimità di tessuto osseo. Poiché, quando si inserisce un impianto, lo strato di ossido può modificarsi ed adsorbire ioni e proteine biologiche indesiderate, e quindi perdere la sua capacità osteoconduttiva, si provvede a derivatizzarlo (l'adsorbimento di questi elementi indesiderati viene scoraggiato). È interessante notare che il  $TiO_2$  ha una struttura simile al  $SiO_2$ , che si trova nel vetro: diventa quindi possibile incorporare nel reticolo fattori utili al processo osteointegrativo (tecniche di *covalent coupling*) [5].

### 3.2 VITI PER IMPIANTI IN TITANIO

Gli impianti osteointegrati in titanio sono gli innesti dentali più diffusi oggi. Con la loro comparsa coincide l'inizio dell'implantologia moderna, la cui evoluzione è proiettata allo studio di metodi sempre più innovativi per la modificazione della superficie delle suddette viti.

Dal punto di vista macroscopico, ovvero della forma dell'impianto e della disposizione delle spire, è utile fare una distinzione tra impianti con forma *cilindrica* e impianti con forma *conica* [2]. I cilindrici (Fig. 3.1) sono stati i primi ad essere sperimentati, per venire successivamente sostituiti dai conici (Fig. 3.2): risultati clinici hanno dimostrato che la forma del cono si adatta meglio al sito di innesto e che determina un migliore ancoraggio osso-impianto a livello di interfaccia. L'osteointegrazione è migliore sia dal punto di vista dei processi biologici e di adesione cellulare, sia per quanto riguarda la distribuzione del carico.



**Figura 3.1:** Vite in titanio cilindrica.



**Figura 3.2:** Vite in titanio conica.

Si trovano in commercio tipi di viti che approssimano un cono nella forma complessiva, ma che in dettaglio sono formate da sezioni cilindriche progressivamente più piccole; non è raro nemmeno l'uso di impianti che combinano entrambi i tipi, cioè dotati di una porzione superiore cilindrica e di una inferiore conica.

La singola o doppia filettatura è un fattore di importanza minore rispetto alla forma, anche se bisogna riconoscere che una maggiore filettatura aumenta l'area superficiale e quindi va ad influire sulla micro-tessitura dell'impianto, ossia sulla rugosità [2]. I profili della filettatura sono arrotondati in modo tale da impedire una concentrazione dello stress in punti indesiderati [6].

E' necessario far presente che molte aziende stanno progressivamente adottando il concetto di *Switching Platform*: la *piattaforma* (o collare), che è la giunzione tra impianto e capsula, risulta essere il punto di massima concentrazione della carica batterica. Per risolvere questo problema e prevenire un calo di tessuto (riassorbimento), si è cambiata la conformazione del moncone in modo da innalzare il punto di attacco dei batteri, per portarlo il più lontano possibile dalla

giunzione e consentire una migliore coesione tra le due parti connesse, quindi una migliore stabilità. Creando una base di appoggio per il tessuto connettivo (la piattaforma non occupata dall'*abutment*), si ha una stabilizzazione delle fibre collagene, si minimizza il riassorbimento osseo e si contribuisce a diminuire lo stress meccanico sull'osso marginale.

### 3.2.1 Confronto tra titanio e materiali ceramici

In ambito implantare, una possibile alternativa al titanio può essere rappresentata dai materiali ceramici. Le *ceramiche di ossido di alluminio* sono composte per il 99,7% di  $Al_2O_3$  e per lo 0.3% di MgO. Mostrano grossi cristalli privi di pori: a causa dell'elevata durezza non possono dunque essere lavorati con strumenti metallici, ma solo con abrasivi diamantati; nell'inserimento degli impianti si deve ricorrere ad attrezzi rivestiti in materiale sintetico. Dal punto di vista delle proprietà, hanno un'alta resistenza alla compressione, ma una bassa resistenza di taglio [2].

Proprietà meccaniche peggiori mostrano le *vetroceramiche*, quindi sono ancora meno indicate per impianti radicolari, ma vengono impiegate come rivestimenti per la loro bioattività. Più adatte risultano invece le *ceramiche in fosfato tricalcico e in idrossiapatite* (queste ultime per la loro porosità). Si precisa che mediante materiali *leganti* quali le leghe in cobalto-cromo-molibdeno o cobalto-cromo-nichel è possibile rivestire un metallo dotato di superficie metallica con un'altra metallica o con una ceramica, con il fine di beneficiare dei vantaggi di due tipi di materiale.

Un confronto tra proprietà meccaniche dei metalli e delle ceramiche è riportato in Tab. 3.4.

<b>METALLI</b>	<b>CERAMICHE</b>
Carico di rottura medio	Piccolo carico di rottura
Resistenza alla trazione media	Piccola resistenza alla trazione
Modulo di elasticità medio (100000-200000 N/mm <sup>2</sup> )	Elevato modulo di elasticità (300000 N/mm <sup>2</sup> )

**Tabella 3.4:** Confronto delle proprietà meccaniche fra metalli e ceramiche.

## 4. LE SUPERFICI DEGLI IMPIANTI IN TITANIO

### 4.1 INFLUENZA DELLA RUGOSITA' E DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA SULLA CONFIGURAZIONE DELLE SUPERFICI IMPLANTARI

Il processo di osteointegrazione, consistente nella migrazione e proliferazione delle cellule osteoblastiche e nelle successive sintesi, deposizione e mineralizzazione della matrice ossea [10], è enormemente influenzato dalla *rugosità* e dalla *composizione chimica* delle superfici, due parametri profondamente correlati fra loro nella determinazione dell'aspetto strutturale e della natura di una superficie implantare.

Essi hanno un ruolo chiave nell'ottimizzazione della risposta biologica dei tessuti perimplantari [11]: conferendo una certa configurazione topografica all'impianto (ne modificano la morfologia, quindi anche l'energia di superficie e la bagnabilità), vanno a condizionare quantitativamente e qualitativamente la neoformazione ossea. Questo si traduce nella capacità di guidare la proliferazione e il differenziamento cellulari, oltre alla produzione ed il rilascio locale di fattori stimolanti la guarigione del sito attorno alla *fixture*.

La rugosità va sicuramente incrementata in situazioni di carico immediato e di innesti di osso in scarsa quantità o di qualità non buona, poiché in questi casi si esige un'elevata resistenza all'interfaccia osso-impianto [12]. Una corretta distribuzione delle forze di carico è difatti consentita solo da una buona stabilità, raggiungibile con una risposta ossea rapida e priva di complicazioni.

E' importante che si rispetti un determinato grado di rugosità soprattutto nelle *fasi iniziali* di integrazione di un impianto, durante le quali un buon contatto osso-impianto è fondamentale perché gli osteoblasti aderiscano efficientemente, proliferino, si differenzino e diano avvio alla sintesi dei componenti della matrice, e perché si verifichi un incremento di produzione della fosfatasi alcalina (agisce nella fase di mineralizzazione), di osteocalcina e di TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E2, una sostanza ormono-simile che aumenta l'aggregazione piastrinica nei processi infiammatori) [10].

L'attacco e l'adesione degli osteoblasti, fasi iniziali del processo osteointegrativo, sono proprio determinati dalla morfologia più che da altre caratteristiche superficiali. Nella fase di *attacco* sono essenziali i microvilli, strutture cellulari che interagiscono con il titanio tramite il legame ionico e le forze di Van der Waals. Nella fase di *adesione* si ha il coinvolgimento della matrice extracellulare, del citoscheletro e dei recettori di membrana. L'attivazione di determinati segnali controlla la



conformazione delle cellule e le guida a differenziarsi: questo può avvenire grazie alle *adesioni focali*, complessi proteici che legano il citoscheletro alla matrice extracellulare [13]; una componente di essi in particolare, la *vinculina*, ha un ruolo primario. Un'altra proteina, l'OPG (osteoprotegerina, glicoproteina inibitrice del riassorbimento osseo), diminuisce l'azione osteoclastica ed agisce quindi sul rimodellamento locale dell'osso che circonda l'impianto.

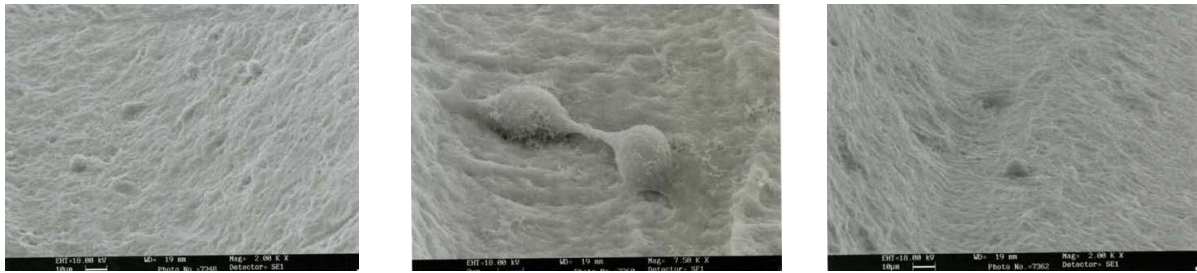
In uno studio in vitro di Passeri et al. (2009) [13] si è valutata la risposta di *cellule osteoblastiche primarie* a diverse superfici, con lo scopo di sottolineare in che modo morfologie differenti modulino in maniera altrettanto differente il comportamento degli osteoblasti, con particolare attenzione ai due processi preliminari prima descritti di attacco e adesione.

Si può notare come le superfici *sabbiate e trattate con attacco acido* e le superfici rivestite con *plasma-spray* rivelino già all'inizio un buon contatto fra le cellule ed una proliferazione elevata di esse sul substrato. Queste superfici, se confrontate con quelle levigate (*polished*) o lisce (*machined*), mostrano adesioni focali diverse, in virtù del fatto che i loro osteoblasti hanno subito uno stress meccanico più intenso (le adesioni sono infatti viste come dei *meccano-sensori* e la loro lunghezza è proporzionale allo sforzo applicato dalle fibre di actina; sono rilevabili sulle direzioni lungo le quali le cellule si adattano alla conformazione delle irregolarità superficiali).

La conseguenza di una migliore adesione si traduce in contatti più forti e stabili tra le cellule: anche se inizialmente le superfici meno ruvide mostrano una maggiore proliferazione e le più irregolari ne rivelano una più lenta, a lungo termine la situazione volge a favore delle seconde, in quanto nelle prime il tasso proliferativo degli osteoblasti si abbassa.

E' ancora in via definizione una rugosità ottimale, anche se, secondo gli studi di Wennerberg et al. [10], un valore di 1.5  $\mu\text{m}$  sembra accettabile se rapportato con altri valori superiori/inferiori o con gli insoddisfacenti valori delle superfici lisce.

Impianti con uno strato di ossido di titanio più spesso forniscono una risposta osteointegrativa ancor più veloce: è il caso, per esempio, delle superfici *nanoporose anodizzate* (Fig. 4.1) [11], nelle quali si nota una porosità a livello di nanoscala, oppure di quelle sottoposte a *doppio attacco acido* (la *fibrina* si fissa bene sulla superficie, determinando un'attivazione massiccia delle piastrine, quindi una valida regolazione della risposta osteogenica).



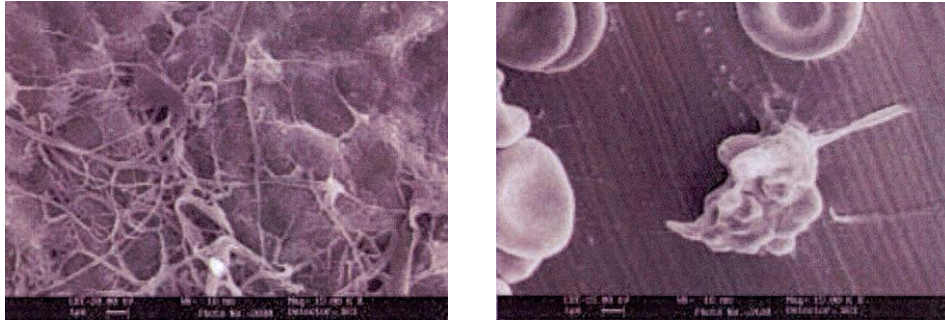
**Figura 4.1:** Impianto con superficie nanostrutturata attraverso processo di anodizzazione: Immagine al SEM 2000x con cellule a 24 ore di proliferazione (a sinistra); processo mitotico sulla stessa superficie analizzata al SEM 7500x (al centro); immagine al SEM 2000x della stessa superficie a 72 ore (a destra) (tratto da *Analisi morfologica e valutazione della proliferazione cellulare in relazione a differenti trattamenti di superficie implantare: studio in vitro*. Conserva E., Tealdo I., Acquaviva A., Bevilacqua E., Volpara G., Pera P. - *Implantologia*, 2005; 4:303-317).

Dati i vantaggi e gli svantaggi che ogni tecnica può rivelare, non è possibile definirne una migliore: diventa allora strategica la combinazione di trattamenti allo scopo di ricavare più benefici insieme. Nel corso dell'ultimo decennio sono stati sviluppati diversi metodi per velocizzare i tempi della guarigione dell'osso attorno all' impianto e per incrementare l'area di contatto tra superficie implantare e tessuto osseo, dalla *sabbiatura*, al *plasma-spray*, agli attacchi *con acidi*. Per esempio, nella sabbiatura, le cellule coinvolte nella neoapposizione di osso mostrano una predilezione diversa per le superfici in base a quanto sono grandi le particelle usate e a come è caratterizzato il mezzo sabbicante: i macrofagi, al contrario dei fibroblasti, preferiscono le superfici ruvide [10].

Lo scopo di "progettare" la morfologia di una superficie (si sfruttano trattamenti che creano la microtopografia desiderata) è il controllo dell'osteogenesi, tenendo conto che rugosità di dimensioni inferiori a quelle delle cellule non consentono a queste ultime di appiattirsi del tutto, promuovendone invece, come desiderato, l'attività osteoblastica (studi di Boyan et al.) [14].

Il *processo coagulativo* risulta altrettanto importante: le indagini di Davies et al. [14] mostrano come le cellule del tessuto connettivo, potenzialmente osteogeniche, abbiano la capacità di migrare attraverso il coagulo che viene inizialmente a crearsi attorno ad un impianto, e si ritrovino poi in un ambiente creato dall'interazione tra sangue e titanio.

L'attivazione delle piastrine consente una corretta guarigione attraverso il rilascio di fattori di crescita e *citochine* (Fig. 4.2):



**Figura 4.2:** Immagini SEM di due diverse superfici esposte al sangue per 30 minuti; a sinistra una superficie nanoporosa, a destra una superficie liscia (tratto da *Valutazione in vitro di una nuova superficie implantare con morfologia nano strutturata*. Morra M., Cassinelli C., Crespi R., Covani U. - Il Circolo, Rivista Periodica di Odontostomatologia, 2004; 1: 13-20).

A questo proposito è stato fatto un passo avanti, nel senso che non ci si è limitati a considerazioni *fisiche* o *meccaniche*, ma si mettono in rilievo aspetti *biochimici*, sottolineando il legame che la morfologia può avere anche con essi. In tutte queste osservazioni è necessario tener conto di una rugosità, come detto prima, dell'ordine o inferiore a quella dei corpi cellulari. Ecco dunque che sotto questo punto di vista la rugosità si caratterizza come "distanza tra gli elementi morfologici" [14] : la grandezza delle proteine si aggira sui 1-10  $\mu\text{m}$ , quella delle cellule sui 1-100  $\mu\text{m}$ , mentre la lunghezza media di una cellula mesenchimale è di 5-12  $\mu\text{m}$ , per cui una rugosità che superi queste dimensioni "viene interpretata dagli osteoblasti che si trovano tra i picchi come superficie liscia" [15].

Le prestazioni più in linea con dimensioni così precise sono date da tecniche di attacco con acido o di anodizzazione piuttosto che da trattamenti più tradizionali come la sabbatura. Quando sono richiesti tali valori di rugosità, si adottano anche processi di finitura superficiale basati sugli ultimi miglioramenti tecnologici.

L'irruvidimento superficiale e le modificazioni chimiche favoriscono dunque l'ancoraggio osseo e la stabilità biomeccanica: tuttavia, nonostante l'efficacia clinica dimostrata dalla gran parte degli impianti disponibili in commercio, non si è ancora riusciti ad individuare con sicurezza l'esatto ruolo, sia a breve che a lungo termine, che i due fattori ricoprono nell'osteointegrazione. Ci si può limitare a constatare con certezza che il controllo di essi consente di analizzare e capire più in profondità gli avvenimenti a livello di interfaccia, dove si verificano interazioni fra tessuti biologici, proteine e impianto [16].

Altra considerazione concerne l'incidenza, ai fini di una corretta integrazione, di ulteriori fattori: dopo che un innesto è stato inserito in un paziente, si pone attenzione fin dal primo momento al carico da sopportare (fattore biomeccanico) e ci si assicura che vengano rispettate adeguate

condizioni di igiene: si può dunque notare come il solo trattamento superficiale non basti di per sé ad assicurare il successo osteointegrativo. La prima manifestazione di un fallimento clinico è l'*osteofibrointegrazione*, che consiste nella formazione di tessuto fibroso attorno all'impianto e nella conseguente perdita di una fissazione meccanica idonea.

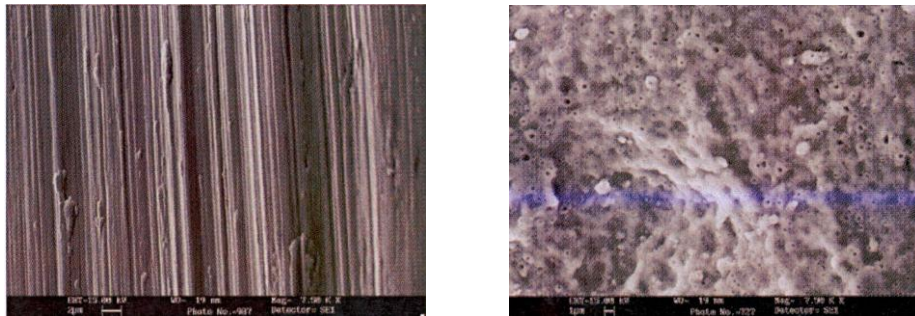
Perché rugosità e composizione chimica vadano ad influire direttamente sull'adsorbimento di utili proteine, che avviene durante il processo osteointegrativo, diversamente dagli impianti in titanio commercialmente puro, alcune superfici vengono rese maggiormente osteoconduttive con *rivestimenti*, per esempio in fosfato di calcio. Si è inoltre rilevato che dalla chimica dipende la caratterizzazione di una superficie *idrofilica*, preferita alle idrofobiche per il miglior legame che si viene a creare con i fluidi ed i tessuti biologici. I valori per la misura di un parametro quale l'*angolo di contatto*, che fornisce l'entità del contatto osso-impianto, coprono un range che va da 0° (superficie idrofilica) a 140° (superficie idrofobica) [16]; i vantaggi apportati dalle superfici idrofiliche devono però ancora trovare riscontro nelle indagini in vivo.

Un aspetto di recente indagine è sicuramente la modificazione a livello biochimico delle superfici implantari: la superficie *bio-ingegnerizzata* [17], mediante "l'azione locale di geni sito-specifici", riesce a controllare le interazioni tra titanio e tessuti biologici, incidendo così nell'avvio dell'osteointegrazione. La topografia superficiale creata dalla rugosità a livello micrometrico influisce in modo tale che le cellule osteoprogenitrici aderiscano localmente ai siti di ancoraggio con il loro citoscheletro, grazie alle *integrine*, e quindi inizino a differenziarsi. Il differenziamento e l'attività degli osteoblasti sono praticamente associati ad un meccanismo di regolazione dell'espressione genica: un cambiamento di forma nelle cellule, a seconda di quanti siti di attacco sulla superficie sono disponibili (questo grazie alla microrugosità superficiale), viene trasmesso al loro nucleo, con conseguente influenza a livello di DNA, quindi di geni.

La rugosità può essere descritta a livello di macro, micro e nano scala [16]. Il livello *macro* comprende un campo che si estende dalle decine di micron ai millimetri: riguarda la geometria dell'impianto sotto un aspetto più complessivo ed è sempre collegata alla stabilità meccanica dell'ancoraggio tra superficie e tessuto, che può venir meno se si sviluppano periimplantiti. Onde evitare questo rischio, si suggerisce di far riferimento ad un livello intermedio più fine, la *microrugosità* (range 1-10 micron), che garantisce una buona interazione all'interfaccia. Dei valori soddisfacenti per elementi micro sono 1.5 µm di profondità, 4 µm di diametro. Viti ruvide con valori simili hanno ampiamente dimostrato di sopportare meglio lo stress di carichi anche notevoli ed una maggiore resistenza al *removal torque* rispetto a viti lisce. La scala *nanometrica* è invece

coinvolta negli eventi molecolari e cellulari dell'osteogenesi; essendo il livello più fine, risulta difficile la sua riproduzione. Non si è dunque ancora arrivati nemmeno a definire un valore ottimale che induca un adsorbimento selettivo di proteine al substrato, sebbene si sia provato che valori di nanorugosità comportano un'accelerazione della guarigione ossea.

In Fig. 4.3 si riportano a titolo di esempio le differenti morfologie di una superficie *machined* e di una nanoporosa.



**Figura 4.3:** Aspetto di una tipica superficie *machined* e di una tipica superficie nanoporosa (analisi con microscopia AFM) (tratto da *Analysis of MG63 osteoblastic-cell response to a new nanoporous Implant surface by means of a microarray technology*. Carinci F., Pezzetti F., Volinia S., Francioso F., Arcelli D. Marchesini I., Caramelli E., Piattelli A. - *Clinical Oral Implant Research*, 2004; 15: 180-186).

#### 4.1.1 Classificazione dei parametri di rugosità

Più rivelarsi difficile fare confronti oggettivi fra le superfici, in quanto non tutte le sperimentazioni riportano lo stesso concetto di rugosità e non ci si riferisce sempre agli stessi parametri di valutazione. Sarebbero auspicabili degli standard che consentano una caratterizzazione adeguata della superficie, e si dovrebbero considerare, oltre ai parametri di altezza, anche quelli bidimensionali e spaziali.

E' stato tenuto come riferimento per molto tempo lo standard di superficie Brånemark [18], ossia una superficie tornita anisotropa con un valore di  $R_a$  (parametro che descrive la rugosità in ampiezza che verrà presto definito) abbastanza piccolo, denominata *machined*, pur essendo che in molti casi si è erroneamente usato questo termine per indicare superfici di test che in realtà non avevano subito tornitura, ma altri tipi di trattamento (sabbatura, attacco con acido, rivestimenti) atti a migliorarne la rugosità.

Non c'è tuttora un utilizzo chiaro della terminologia, soprattutto se si considera che nei diversi trattamenti la rugosità e la chimica superficiale si influenzano tra loro fornendo una vasta gamma di opzioni che complicano la varietà di tipologie implantari. Inoltre l'uso di tecniche di indagine, a

volte imprecise, pregiudica la descrizione topografica dei dettagli (il SEM non è sempre uno strumento adatto a certi tipi di analisi).

I parametri [18] più utilizzati sono rispettivamente:

- $R_a$  ( $S_a$  nel 3D): è la media aritmetica di un profilo ( $R_a$ ) o di una superficie ( $S_a$ ) (media aritmetica delle deviazioni del profilo reale rispetto al valore medio); è anche definito parametro di ampiezza;
- $R_q$  ( $S_q$  nel 3D): è lo scarto quadratico medio di un profilo ( $R_q$ ) o di una superficie ( $S_q$ ) (media quadratica delle deviazioni del profilo reale rispetto al valore medio); dà informazioni simili a  $R_a$ , ponendo una maggiore attenzione sugli elementi più alti e su quelli più bassi;
- $R_z$  ( $S_z$  nel 3D): consiste nella media aritmetica dei cinque picchi più alti e delle cinque valli più basse sul profilo o sulla superficie, quindi copre in tutto dieci elementi morfologici in un dato intervallo; è definito anche parametro verticale e può fornire informazioni sulla tipologia delle irregolarità;
- $R_t$  ( $S_t$  nel 3D): è la distanza massima tra il picco più alto e la valle più bassa nel profilo o sulla superficie;
- $S_{ds}$ : è un parametro spaziale che descrive il numero di picchi per unità di superficie;
- $S_{dr} [\%]$ : è un parametro che considera il numero e l'altezza dei picchi su una data superficie ed esprime la densità spaziale, oltre a fornire l'incremento dell'area superficiale (grazie all'irruvidimento) rispetto a quella di partenza; nel caso di abbia un  $S_{dr}=100\%$ , si ha un raddoppiamento di area.

Quando si valuta la rugosità secondo il parametro  $S_a$ , per le superfici lisce si va sotto i  $0.5 \mu\text{m}$ , per quelle leggermente ruvide si ha un intervallo di  $0.5-1 \mu\text{m}$ ,  $1-2 \mu\text{m}$  per le moderatamente ruvide ed infine si è sopra i  $2 \mu\text{m}$  per quelle più ruvide, le quali dimostrano anche una risposta ossea migliore rispetto alle altre. Questi valori, da uno studio di Albrektsson et al., (2004) [18], rendono già più precisa la caratterizzazione della rugosità, pur essendo che, come detto prima, non è stato ancora definito uno schema definitivo di riferimento.

Si può affermare con certezza che impianti lisci non presentano forte attrito al contatto con il tessuto (di conseguenza la ritenzione meccanica è scarsa) e che determinano un appiattimento delle cellule sulla superficie, mentre impianti con rugosità moderata incoraggiano maggiormente l'incastro fra osso e superficie; naturalmente, la ritenzione in quelli più irruviditi è maggiore, anche se non è detto che avvenga una migliore osteogenesi rispetto a superfici meno ruvide, data la complessità delle relazioni tra i diversi fattori coinvolti nei processi di osteointegrazione.

Anche se le superfici lisce e levigate non assicurano una stretta interazione tra tessuto e impianto rispetto a quelle più ruvide, sono ancora molto diffuse in qualità di termini di confronto per l'analisi delle proprietà superficiali. Dall'altra parte, non sempre tutte le superfici ruvide progettate nel tempo si sono dimostrate all'altezza di soddisfare i requisiti per una buona osteointegrazione: per esempio, un trattamento come l'*elettroerosione* porta all'incorporazione di impurità nella superficie, le quali costituiscono sicuramente uno svantaggio per il contatto all'interfaccia.

Oltre alla rugosità, un altro fattore che incide sulla topografia di superficie è l'*orientamento*: se una superficie è chiaramente orientata (tornita, fresata) è *anisotropa*, *isotropa* se non si riesce ad individuarne l'orientamento (sabbata, mordenzata). Tuttavia, nonostante numerose sperimentazioni (Wennerberg et al., Höstner et al.) [18], non si è ancora arrivati a stabilire l'esatto ruolo dell'orientamento nel favorire i processi osteointegrativi, né la sua diretta correlazione con la rugosità: sembra infatti che l'isotropia o l'anisotropia non influiscano quasi per nulla nell'ancoraggio tra osso e impianto.

Rimane tuttora non sufficientemente conosciuto l'effetto della *nanorugosità* sulle superfici, questo a causa dei limiti degli studi *in vitro*, nei quali si riproducono solo artificialmente determinate condizioni biologiche (i fattori vascolari, ormonali e di carico sono difficilmente riproducibili), pur essendo essi indicativi per test preclinici [13]: non si può dunque affermare con certezza se *in vivo* ci sia un valido contributo di rugosità soltanto a livello micro o se anche la nanoscala abbia un'influenza significativa sulla risposta ossea.

#### **4.2 UN CODICE STANDARD DI CLASSIFICAZIONE PER LE SUPERFICI IMPLANTARI**

L'intimo contatto tra impianto e osso permesso dall'osteointegrazione comporta una certa stabilità dal punto di vista clinico, in quanto la tensione indotta sul sito implantare porta ad un'ossidazione sul titanio di partenza, quindi lo strato aumenta di spessore, con una conseguente incorporazione di ioni calcio e fosforo.

Per un migliore ancoraggio all'interfaccia possono essere adottate due tecniche: una cambia la topografia dal punto di vista *fisico*, l'altra prende in considerazione delle modificazioni dal punto di vista *chimico*, cioè vengono aggiunte allo strato di ossido componenti inorganiche, come il fosfato di calcio. Nel primo approccio si sfrutta il fatto che più una superficie è ruvida, più aumenta l'area superficiale disponibile per il collegamento biomeccanico tra osso e impianto, almeno fino ad un certo livello di rugosità. Addirittura, a livello nanometrico, la rugosità influisce molto positivamente sull'osteointegrazione, aumentando l'energia di superficie e migliorando

l'adsorbimento delle proteine della matrice. Nel secondo approccio, il legame tra queste ultime e il  $\text{TiO}_2$  è di tipo biochimico, non fisico; in particolare le cosiddette modifiche superficiali biochimiche consistono nell'incorporazione di molecole organiche (proteine o enzimi) in grado di indurre risposte specifiche nei tessuti che circondano l'impianto.

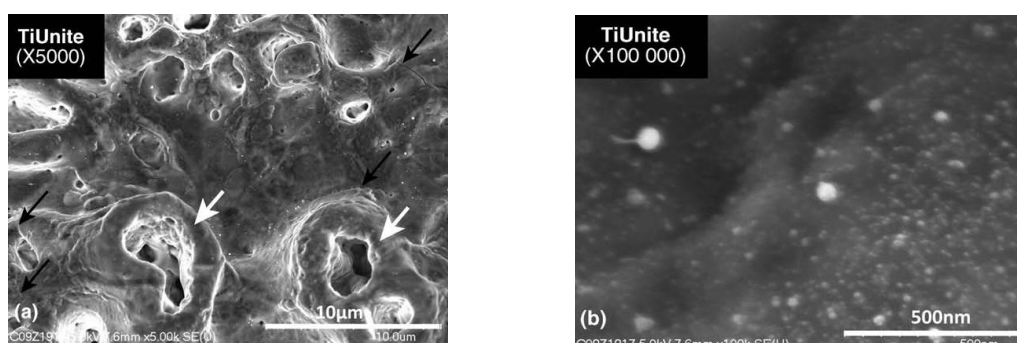
Inizialmente, nei primi esperimenti, i trattamenti riuscivano a modificare poco la superficie e fornivano una rugosità minimale. Col tempo le tecniche si sono sempre più affinate, anche grazie alla combinazione fra i vantaggi delle modificazioni fisiche e gli apporti di quelle chimiche.

Per esempio la *sabbiatura* (con particelle di silice, allumina o anche idrossiapatite) viene solitamente fatta seguire dall'*attacco acido* (fluoridrico, nitrico o solforico) che ha la capacità di rendere omogenei i solchi ed eliminare i residui lasciati dall'altro trattamento.

L'*anodizzazione* elettrochimica consente di ottenere risultati a livello sia fisico che chimico in un'unica tecnica: lo strato di ossido si ispessisce e contemporaneamente si arricchisce di ioni, consentendo alla superficie di assumere un aspetto poroso a livello di micro o nanoscala.

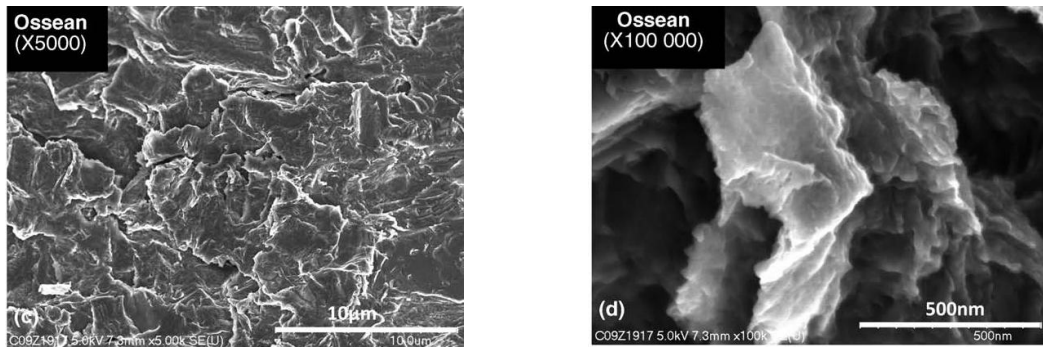
Altro esempio utile è il *PSHA*, ovvero il rivestimento plasma spray con idrossiapatite (un ceramico), tecnica che rende lo strato di ossido particolarmente osteoconduttivo, con lo svantaggio di avere però un'interfaccia tra rivestimento e titanio non resistente dal punto di vista meccanico. Trattamenti quali la *deposizione sol-gel*, quella *sputtering* o la *IBAD* (assistita da raggio ionico), oppure l'*impregnazione* con fosfati di calcio sono state inoltre sviluppati per creare dei rivestimenti sottili (spessore inferiore ai  $5\ \mu\text{m}$ ).

Nelle Figure 4.4, 4.5 e 4.6 si riportano degli esempi di superfici sottoposte a diversi trattamenti:

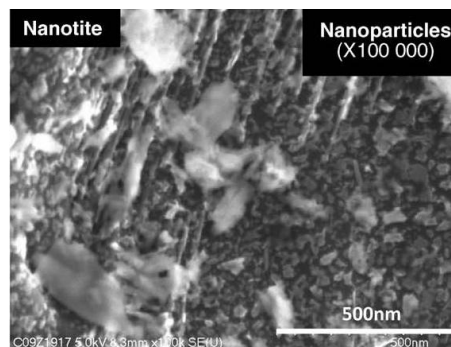


**Figura 4.4:** Morfologia caratteristica di una superficie anodizzata a due diversi ingrandimenti (tratto da *Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography*. Dohan Ehrenfest D.M., Coelho P.G., Kang B.S., Sul Y.T., Albrektsson T. - Trends in Biotechnology, 2010; 28(4):198-206).





**Figura 4.5:** Morfologia caratteristica di una superficie sabbata e successivamente mordenzata a due diversi ingrandimenti (ibidem).



**Figura 4.6:** Superficie sottoposta a doppio attacco acido e successivamente ricoperta di nanoparticelle in fosfato di calcio (ibidem).

Si può notare come risulti arduo esaminare le innumerevoli tecniche tenendo conto di tutti i parametri e le variabili di ognuna (temperatura e durata del processo, tipo delle particelle da utilizzare, concentrazione di una certa sostanza): ecco quindi che un tentativo di classificazione, anche se in continua evoluzione e non ancora ben definito ed universalmente riconosciuto, può venire in aiuto per un'adeguata analisi.

Gli studi sull'osteointegrazione e sui trattamenti atti a migliorare l'osteconduttività delle superfici implantari hanno permesso la creazione nel tempo di una proposta di *codice standard* [19] che si avvicini il più possibile ad una classificazione oggettiva delle caratteristiche superficiali. Il quadro che verrà descritto prende in considerazione la composizione di partenza e le modifiche fatte in seguito, di natura strutturale, chimica e biochimica.

Dal punto di vista della struttura superficiale, quindi delle caratteristiche fisiche a livello di micro o nano scala, è stata possibile la definizione di termini quali *microrugosità*, *nanorugosità*, *microporosità*, *nanopattern* (per citarne alcuni), che contribuiscono ad un'identificazione più precisa per un'eventuale superficie analizzata. Per determinare una data superficie nelle sue proprietà fisiche e chimiche è inoltre necessaria l'investigazione dei suoi parametri tramite metodi standardizzati di analisi, come la spettroscopia, la microscopia elettronica e l'interferometria.

Gli impianti osteointegrati rispettano, nel sistema di codifica, una tabella a cinque voci (*core, mod, micro, nano, archi*), raggruppate in due macrosezioni (Fig. 4.7): una considera la *composizione chimica* del materiale e le sue modificazioni biochimiche, l'altra riguarda la *topografia* a livello micro e nano, oltre all'*architettura* globale della superficie.

Il *core material*, il materiale di base della superficie, è quello che subisce le modificazioni di molecole o ioni, sia esternamente che internamente. Attualmente il titanio e la zirconia sono i materiali di partenza più diffusi in commercio. Per quanto riguarda il *titanio*, quello più puro, ossia con meno percentuali di impurezze, permette una buona osteointegrazione, ma minori prestazioni meccaniche, le quali vengono invece fornite dall'impiego della lega Ti6Al4V o dal titanio grado 4. Gli impianti in *zirconia* sono stabilizzati del tutto (Y-TZP, *yttria-stabilized tetragonal zirconia*) o parzialmente (Y-PSZ, *yttria-partially tetragonal zirconia*).

La *composizione chimica* superficiale viene valutata attraverso diversi metodi di analisi: la XPS (spettroscopia fotoelettrica a raggi X) determina la composizione atomica media ed è la più adatta a caratterizzare una superficie dopo che è stata modificata chimicamente; la AES (spettroscopia elettronica Auger), meno accurata della XPS, analizza in modo approfondito lo strato di base; la EDX (*energy dispersive X-ray spectroscopy*) è un'analisi al SEM in grado di rilevare bene singole particelle o strutture.

L'*impregnazione* ed il *rivestimento* sono le modificazioni chimiche e biochimiche riferite alla seconda sottosezione della prima macrosezione della tabella. L'*impregnazione* implica un'integrazione completa della sostanza nella struttura di base (un esempio sono i *fosfati di calcio* che possono impregnare uno impianto in titanio). Essa ha poi diversi livelli, dipendenti dalle percentuali di modificazione: residuo (*residual*, è il più basso), meno elevato (*low*) e più elevato (*high*). L'ultimo grado (*high*) si raggiunge in particolare con l'anodizzazione elettrochimica, ma bisogna tenere conto che durante le lavorazioni si hanno anche delle contaminazioni dall'ambiente esterno (carbonio) che vanno a sovrapporsi. Il *rivestimento* prevede invece che l'adiuvante chimico o biochimico venga associato solo superficialmente allo strato di base, anche se risulta inevitabile una impregnazione parziale. I rivestimenti possono essere di tipo *continuo*, *discontinuo* o *a spruzzo*. Poiché a volte non si riesce a distinguere tra rivestimento e materiale di base (a causa dell'incremento dello strato di ossido in seguito al trattamento), un rivestimento più spesso di 100 nm è considerato come *core material*. Se quindi una superficie sarà rivestita di fosfato di calcio per uno spessore per esempio di 400 nm, essa verrà considerata una superficie di base in fosfato di calcio di 400 nm senza modificazioni chimiche; al contrario, se il rivestimento è

spesso 40 nm, esso costituisce una modificazione chimica del *core material*. L'ulteriore voce *pollution* è un parametro che riguarda una contaminazione di tipo organico (carbonio che si accumula sull'impianto) o inorganico (ioni indesiderati di Mg, S, Si, Ca e Zn), la cui distribuzione è in entrambi i casi disomogenea e deve essere distinta dagli elementi introdotti intenzionalmente. La presenza di contaminanti può aumentare durante determinate fasi del processo di lavorazione nelle quali si ha contatto con l'aria e con l'ambiente esterno, per esempio durante il confezionamento.

Un parametro non visibile in tabella, ma che è doveroso citare, è la *cristallinità*: tutti i materiali usati come base negli impianti hanno una struttura cristallina. Il  $\text{TiO}_2$  è reperibile nello stato amorfo o nelle forme cristalline di anatasio, rutilo (forma più stabile e comune) e brookite. Le caratteristiche granulometriche e le proporzioni nelle fasi cristalline danno un contributo alla caratterizzazione completa di un materiale.

Nella macrosezione *fisica* della tabella si nota l'importanza della topografia e la conformazione dei picchi e delle valli fornita dal grado di rugosità, quantificabile con profilo bi-dimensionale o tri-dimensionale (più completo) e trattabile sotto due scale di grandezza, la micro e la nano.

Nonostante l'area superficiale di contatto cresca all'aumentare della rugosità, la condizione di dinamismo tipica del tessuto osseo richiede, per il rimodellamento, spazi superiori a 50  $\mu\text{m}$ : questa area, funzionale ai processi di osteointegrazione, risulta inferiore a quella che si avrebbe teoricamente a disposizione; inoltre, l'influenza dei vari modelli di microtopografia sull'osteococonduzione resta ancora poco chiara.

Per quanto riguarda il tipo di morfologia, le microstrutture sono definite in base al numero di dimensioni: la *microrugosità* comprende una dimensione ed è relativa ad un parametro, l'altezza dei picchi; i *modelli micro* sono in 2D (un esempio è la microporosità creata con anodizzazione) e sono basati su un criterio di ripetitività di determinati elementi morfologici; le *microparticelle* riguardano la composizione analizzata in 3D. Il parametro di rugosità  $S_a$  comprende quattro categorie, che in ordine crescente vanno dalla superficie più liscia (*smooth*, 0-0.4  $\mu\text{m}$ ) a quella più ruvida (> 2 $\mu\text{m}$ ). La descrizione topografica si completa con il parametro di densità spaziale  $S_{dr}\%$ , a seconda che la superficie sia piana o irregolare.

Le *nanostrutture* consentono un aumento dell'energia di superficie, quindi della bagnabilità nei confronti del sangue, influenzando direttamente l'azione della fibrina e i legami con le proteine della matrice. Un *modello nanostrutturale* può di conseguenza modulare il differenziamento cellulare e la guarigione ossea, soprattutto nella fase iniziale. Si precisa che tutte le strutture

presentano una *nanotopografia*, ma che solo alcune possiedono delle *nanostrutture* significative, ovvero oggetti con dimensioni comprese tra 1 e 100 nm (intermedie tra dimensioni molecolari e micrometriche). Come per la microscala, sono usati i termini *nanorugosità* (1D), *modello nano* e *nanoporosità*(2D), *nanoparticelle* (3D). Anche qui, se non sono applicabili i criteri di omogeneità superficiale o di ripetizione di elementi morfologici, la superficie va classificata come *nanosmooth*. La valutazione della topografia può avvenire con l'AFM (microscopia a forza atomica), più utile per i modelli nano piuttosto che per i micro; l'IFM (interferometria ottica), molto utile per l'analisi micro anche se con l'ausilio del filtraggio; la (FE)-SEM (propulsione elettrica ad emissione di campo) è una tecnologia standard, adatta ad entrambe le scale, in grado di individuare la composizione elementare delle strutture sotto osservazione. E' importante la scelta degli strumenti di analisi, in quanto una buona valutazione morfologica consente una caratterizzazione superficiale più precisa.

La sottosezione relativa alla struttura (*archi*) include il concetto di *architettura frattale* (molte strutture biologiche presentano degli schemi che si ripetono nella stessa maniera anche ad una scala diversa), l'omogeneità o l'eterogeneità della superficie e la presenza di cricche più o meno estese.

Nel momento in cui sono disponibili parametri provenienti da una codifica standard (tenendo presente che è pur sempre un tentativo e che ha i suoi limiti) è possibile condurre delle osservazioni più precise sulle prestazioni di un impianto e sulla risposta biologica di una superficie a determinate modifiche fisiche o chimiche. Nelle superfici in titanio la chimica superficiale influisce soprattutto sullo strato di ossido, il cui incremento di spessore è direttamente proporzionale ad una risposta ossea più forte (come negli impianti anodizzati). Quest'ultima è anche favorita da una stimolazione diretta delle cellule, che avviene grazie all'impregnazione o rivestimento con elementi inorganici capaci di favorire l'adesione di proteine. Per esempio, anche se il meccanismo di base non è ancora stato indagato in profondità, rivestimenti con fosfati di calcio, con fosforo oppure magnesio, dimostrano una buona risposta osteointegrativa.

Sebbene si possa disporre, come nei parametri sopra descritti, di un valido schema di classificazione, in molti casi non si riesce comunque a correlare tra loro influenze morfologiche e influenze chimiche, con la conseguenza di non riuscire a comprendere appieno tutti gli effetti biologici di una modificazione. Quando si effettuano dei confronti per decretare la superiorità di una superficie rispetto ad altre, non si deve semplicemente collegare una modificazione superficiale ad una determinata risposta biologica attraverso un singolo parametro, ma si devono

considerare diversi aspetti e più parametri insieme. Altra cosa da evitare è di classificare la superficie solo in base al trattamento e non in base alle sue caratteristiche fisico-chimiche, criterio che consente invece una visione più completa. Resta il fatto che vi è una minore chiarezza per quanto concerne le modificazioni chimiche che non quelle fisiche, in quanto le seconde sono state finora maggiormente studiate su impianti disponibili in commercio.

La progettazione di una specifica micro o nanotopografia con il fine di controllare il differenziamento cellulare è oggetto di attuali sperimentazioni: la correlazione tra caratteristiche di un impianto e risposte tissutali attraverso l'ottimizzazione dei parametri superficiali è fondamentale per lo sviluppo di prodotti sempre più soddisfacenti. Gli elementi già standardizzati potranno essere perfezionati o lievemente modificati, altri potranno essere compresi negli aspetti ancora non chiari, così da poter avere informazioni sufficientemente dettagliate ed accessibili.

Level of characterization			Characteristics and their definitions.		Tools required for characterization and suggested guidelines.
Type	Code	Definition	Code	Definition	
Chemical	Core	Core material	G4Ti G5Ti YTZP YPSZ PSHA	Commercially Pure Grade 4 Titanium Ti-6Al-4V Grade 5 Titanium Yttria-stabilized Tetragonal Zirconia Polycrystals Yttria-Partially Stabilized Zirconia Plasma-Sprayed Hydroxy-Apatite (thick coating)	1/ XPS for accurate atomic composition, on a 300 µm diameter round area.  2/ AES for in-depth elemental profiling down to 100nm deep. Two acquisitions, on a peak and in a valley of the microtopography.  3/ EDX probe for chemical identification of structures observed during morphology examination with SEM.
	Mod	Modification	X-RI X-LI X-HI  X-CC X-DC X-SC  OPol X-IPol	<b>Impregnation</b> (elements X <b>within</b> the core material) <1% : Residual Impregnation 1 to 5% : Low Impregnation > 5% : High Impregnation  <b>Coating</b> (elements X <b>on</b> the core material) Continuous Coating. On the whole surface Discontinuous Coating. >50% total surface Sprinkled Coating. <50% total surface  <b>Pollution</b> Organic pollution Inorganic pollution. X = elemental composition	
Physical	Micro	Microtopography	R	<b>1/ Morphology type (number of dimensions D)</b> Rough (1D)	1/ FE-SEM and metrologic software for : - direct characterization of the surface morphology at the micro and nanometer levels. - quantitative morphology for the evaluation of height deviation amplitude (Sa) and spatial density (Sdr%) at the micrometric level. - revealing fractal architectures and repetitive profiles down to the nanometric level.  2/ Interferometer (IFM) on a 230x230 µm square area, for evaluation of the mean height deviation amplitude (Sa) and spatial density (Sdr%) at the micrometric level.  3/ AFM on a 20x20 µm square area for a non quantitative overview of the nanotopography.
			Pa/Po X-Pt	Patterned or Porous (2D) Particle (3D). X = elemental composition	
			S Mi Mo Ma	<b>2/ Height deviation amplitude (Sa)</b> Smooth. Sa = 0 to 0.4 µm Minimal. Sa = 0.5 to 1 µm Moderate. Sa = 1 to 2 µm Maximal. Sa > 2 µm	
	Fo Ru	<b>3/ Spatial Density (developed area ratio, Sdr%)</b> Flattened out. Sdr% < 100% Rugged. Sdr% > 100%			
Nano	Nanotopography (number of dimensions D)	S R Pa/Po/T X-Pt	Smooth Rough (1D) Patterned/Porous/Tubes (2D) Particle (3D). X = elemental composition		
Archi	Global architecture	F/NF Ho/He LC/EC X-RP	Fractal/Non Fractal Homogeneous/Heterogeneous Local Cracks/Extended Cracks along the surface Random Particle. X = elemental composition and associated characteristics		

**Figura 4.7:** Sistema di codifica per superfici implantari osteointegrate (tratto da *Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography* Dohan Ehrenfest D.M., Coelho P.G., Kang B.S., Sul Y.T., Albrektsson T. - Trends in Biotechnology, 2010; 28(4):198-206).

## 5. TRATTAMENTI SUPERFICIALI PER SUPERFICI IMPLANTARI

### 5.1 PANORAMICA SULLE TIPOLOGIE DI TRATTAMENTI

I trattamenti per impianti che modificano la rugosità e la chimica superficiali con il fine di creare topografie ben precise, riguardano tutti un'alterazione del metallo di base, in specifico dello strato di ossido per le superfici in titanio. La letteratura comprende non una, ma vari tipi di classificazioni delle tecniche utilizzate, in quanto, essendo che una singola modificazione riguarda diversi aspetti, essa può essere vista da angolazioni differenti comunque fra loro correlate [18, 20, 21].

Sotto il punto di vista della conformazione che la superficie presenta una volta subito il trattamento, si distinguono impianti modificati con tecniche *additive* oppure *sottrattive* [18]. Un profilo convesso, ovvero con picchi pronunciati, corrisponde alla prima definizione; un profilo concavo, in cui risultano più evidenti cavità o pori, alla seconda. Tra i processi aggiuntivi vi sono i *rivestimenti* in idrossiapatite o in fosfati di calcio, il TPS (*titanium plasma-spray*) e la *deposizione ionica*. Tra i procedimenti sottrattivi si hanno *l'elettrolevigatura*, la *levigatura meccanica*, la *sabbatura*, *l'attacco con acido* e *l'anodizzazione elettrochimica*.

Per quanto concerne invece la natura della modifica [22] che una lavorazione superficiale può comportare, la morfologia può essere influenzata *fisicamente*, *chimicamente* oppure con *mezzi biochimici* (si rendono cioè le superfici biologicamente attive).

Una superficie opportunamente alterata rilascia ioni o molecole in grado di stimolare la membrana cellulare ed attivare i suoi recettori, in modo che le cellule vengano avviate all'adesione e alla differenziazione. Si ricorda inoltre che sotto l'aspetto biomeccanico una determinata microtopografia conferisce una certa conformazione ai campi tensionali e deformativi, in modo che si verifichino reazioni sia fra superficie e proteine che tra superficie e cellule [22].

Seguirà un'esposizione dei diversi trattamenti superficiali impostata principalmente sul secondo criterio, forse più comprensivo di tutte le tecniche, con ulteriori riferimenti ai casi di processi sottrattivi o additivi; si è scelto di trattare in altre due sezioni separate i rivestimenti, categoria all'interno della quale si sono inseriti il titanium-plasma-spray e i fosfati di calcio, ed i trattamenti biochimici. Anche le modifiche elettrochimiche come l'anodizzazione, che hanno comunque natura chimica, sono distinte dalle altre per maggiore chiarezza espositiva. Seguono poi quattro sezioni di approfondimento che permettono di mettere a confronto trattamenti diversi (una prima sul comportamento delle cellule simil-osteoblastiche SaOS-2 su impianti diversi, una seconda sulle superfici nanostrutturate, una terza sulla tecnologia microarray ed una quarta sulla particolarità

delle superfici differenziate). Si espongono infine delle considerazioni sulle tecniche di decontaminazione degli innesti.

## 5.2 TRATTAMENTI FISICI DI TIPO MECCANICO

I trattamenti di tipo fisico [22] modificano la superficie mediante l'applicazione di azioni esterne: verranno viste in particolare le lavorazioni di tipo meccanico, come il taglio, la tornitura, la levigatura ed infine la sabbiatura.

### 5.2.1 Superfici *machined*

Si è pensato di classificare con la denominazione *machined* tutte le superfici che subiscono tornitura, levigatura o fresatura, e che sono utilizzate a livello di sperimentazioni, in virtù della loro regolarità, come termine di confronto con superfici molto ruvide [18]. Più trattamenti sottrattivi sono accomunati sotto questo stesso nome anche per le simili dimensioni degli elementi morfologici risultanti [22]: le superfici si presentano abbastanza semplici dal punto di vista geometrico ed eventuali solchi sono dovuti ai processi di lavorazione [15].

Il *tornio* consente di ottenere un prodotto valido e caratterizzato da una distribuzione anisotropa: nel caso dei metalli la tornitura crea una rugosità media ( $R_a$ ) di circa 0.3-0.6  $\mu\text{m}$ , dovuta a delle deformazioni della struttura cristallina [22].

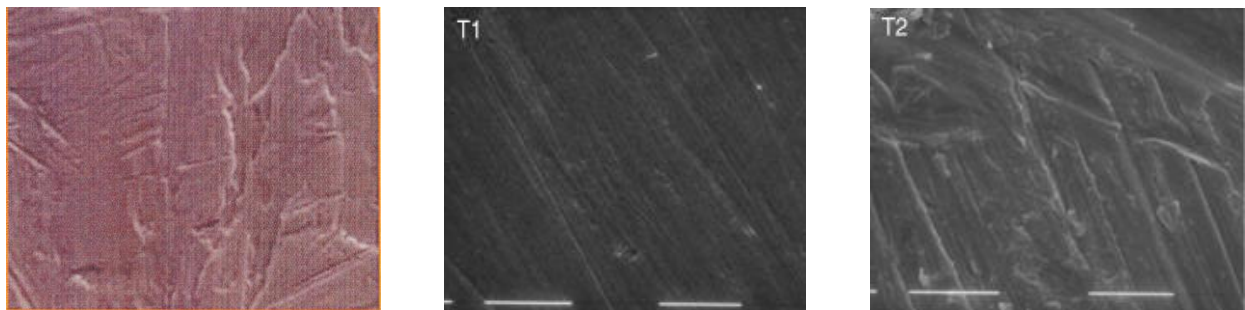
Le superfici *levigate* vengono trattate con carta vetrata o panni abrasivi, usando in sequenza particelle abrasive (generalmente in corindone) di dimensione sempre più piccola in modo tale da non rovinare la superficie con graffiature. La superficie è chiamata *polished* se le particelle usate sono più fini, altrimenti *grinded* per avere risultati più grezzi. Le particelle possono talvolta contaminare il metallo di base incorporandosi in esso: poiché i residui potrebbero risultare tossici, dovranno essere rimossi pulendo la superficie per esempio con solventi. Le superfici levigate più ruvide raggiungono anche 1  $\mu\text{m}$  ( $R_a$ ), anche se sono sempre considerate, in assoluto, poco ruvide. Una alternativa al procedimento abrasivo è l'allumina in polvere [22].

Sebbene le superfici *machined* (Fig. 5.1) presentino una rugosità non così marcata, caratterizzano pur sempre la superficie in ambito micrometrico se la precisione dei difetti è elevata: più le particelle risultano fini, più il grado di levigatura è accurato.

Alcuni studi [18] hanno messo in evidenza che a volte le *machined* possono presentare una rugosità che si avvicina a quella di superfici mediamente irregolari, rivelando di conseguenza una sostanziale somiglianza a queste ultime anche dal punto di vista dell'area di contatto osso-

impianto; d'altra parte, vi sono anche superfici classificate con il medesimo termine *machined*, ma che hanno valori di  $R_a$  molto variabili tra loro [18]. Quando si verificano queste situazioni non ci si deve eccessivamente stupire: come già sottolineato in precedenza, nell'analisi delle superfici non c'è ancora un sistema di valutazione ben definito che consenta di correlare fra loro anche delle apparenti contraddizioni.

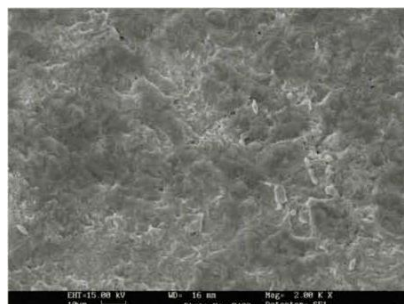
Una superficie più grossolana, non citata fra le *machined*, è quella ottenuta con un dispositivo di *taglio* come la sega circolare: in questo caso il grado di rifinitura è talmente basso che la superficie non risulta adatta ad applicazioni implantari, soprattutto per le scarse potenzialità meccaniche che presenta [22].



**Figura 5.1:** Ingrandimenti al SEM di una superficie liscia (3000x), di una superficie *polished* (2500x) e di una genericamente *machined* (2500x).

### 5.2.2 Superfici sabbiate

La sabbatura (*blasting* o *grit-blasting*) è un processo meccanico di tipo sottrattivo. Tra le particelle sabbianti disponibili, si preferiscono quelle che lasciano una quantità minima di residui: vengono solitamente usate *allumina* ( $Al_2O_3$ ), *corindone* (forma minerale dell'  $\alpha$ -allumina, a sua volta forma stabile dell'allumina), *fosfati di calcio* (*idrossiapatite*), *biossido di titanio* e *rutilo* (somigliante al Ti). La morfologia delle superfici sabbiate [15] è abbastanza regolare (Fig.5.2), anche se non omogenea quanto le *machined*, e con cavità vicine tra loro alternate a piccoli picchi.



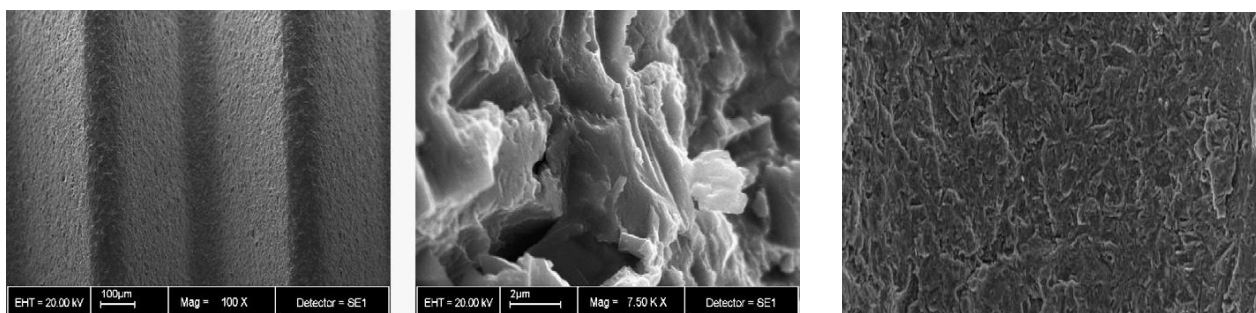
**Figura 5.2:** Ingrandimento al SEM di una superficie sabbata.



La rugosità che si va a creare è di tipo *macro* ed i vari gradi dipendono dalla grandezza delle particelle del mezzo sabbiante (per esempio, particelle in ossido di titanio con una dimensione di circa 25  $\mu\text{m}$  producono una rugosità di 1-2  $\mu\text{m}$ ) [16]; a volte si combinano insieme particelle di dimensioni differenti, che devono in ogni caso essere sempre chimicamente stabili e biocompatibili [22]. Esse vengono fatte fuoriuscire ad alta velocità e ad aria compressa da un eiettore: la dinamica del contatto con la superficie produce delle irregolarità più marcate rispetto ad una superficie liscia.

La sabbatura con *allumina* (Fig. 5.3) produce una rugosità che varia con la granulometria; le particelle vengono incorporate nella superficie e, risultando insolubili in acido [16], anche dopo una sterilizzazione lasciano dei residui potenzialmente tossici per i tessuti, che possono gravemente compromettere l'osteointegrazione. Se confrontate con il corindone, le particelle più grandi dell' $\text{Al}_2\text{O}_3$  (diversa granulometria) forniranno una rugosità maggiore, che si traduce in una più alta percentuale di contatto fra impianto e tessuto [22].

Un'alternativa è costituita dal *biossido di titanio* ( $\text{TiO}_2$ ) (Fig. 5.3), che determina una rugosità moderata: rispetto all'allumina non ha problemi di tossicità e, se rapportato alle superfici più lisce, fornisce risultati nettamente superiori, oltre ad un alto tasso di successo clinico. Sia in questo caso che nel precedente non si sono però mostrate delle grosse differenze nella formazione di nuovo osso rispetto alle superfici *machined*: questo significa che la fissazione meccanica con le sabbate aumenta, ma quella biologica resta pressoché inalterata (studi di Le Guéhennec et al.) [16]. I fosfati di calcio (*idrossiapatite*, fosfato  $\beta$ -tricalcico) sono mezzi sabbianti molto più osteoconduttivi (la superficie si arricchisce di Ca e P) e altamente riassorbibili: al contrario per esempio dell'allumina non lasciano tracce residue, ma le prestazioni dal punto di vista osteointegrativo non si discostano sostanzialmente dagli altri due tipi di sabbatura [16].



**Figura 5.3:** A sinistra due in gradimenti SEM di una superficie sabbata con  $\text{TiO}_2$ , a destra una superficie sabbata con allumina.

Mentre con la maggior parte dei mezzi sabbianti le particelle più grosse generano rugosità più grezze e quelle più fini rugosità più precise, per il rutilo questo discorso non è valido: per questo minerale solo le misure intermedie producono una rugosità meglio distribuita e più omogenea (le particelle più grandi ne creano invece una disomogenea) [22]. Wennerberg et al. hanno individuato, per le superfici in questione, un possibile buon valore per il parametro  $S_a$  in  $1.5 \mu\text{m}$  e un aumento circa doppio dell'area superficiale [18].

Rapportate alle superfici *machined*, le sabbiate promuovono una risposta ossea maggiore, nonostante la diversità di valori (Tab. 5.1) dei vari studi, dovuta alle differenze nelle tecniche e nelle apparecchiature di misurazione. Si precisa che le sperimentazioni cliniche non sempre hanno portato ai risultati positivi conseguiti nelle precedenti indagini su animali.

MATERIALE	$R_a$ ( $\mu\text{m}$ )
Ti turned	$0.34 \pm 0.1$
Ti turned + blasted (rutile $25 \mu\text{m}$ )	$0.96 \pm 0.3$
Ti turned + blasted (alumina $25 \mu\text{m}$ )	$0.84 \pm 0.2$
Ti turned + blasted (alumina $75 \mu\text{m}$ )	$1.32 \pm 0.3$

**Tabella 5.1:** Rugosità su superfici in Ti tornite e sabbiate con particelle differenti per natura e grandezza (tratto da [22])

### 5.3 TRATTAMENTI CHIMICI

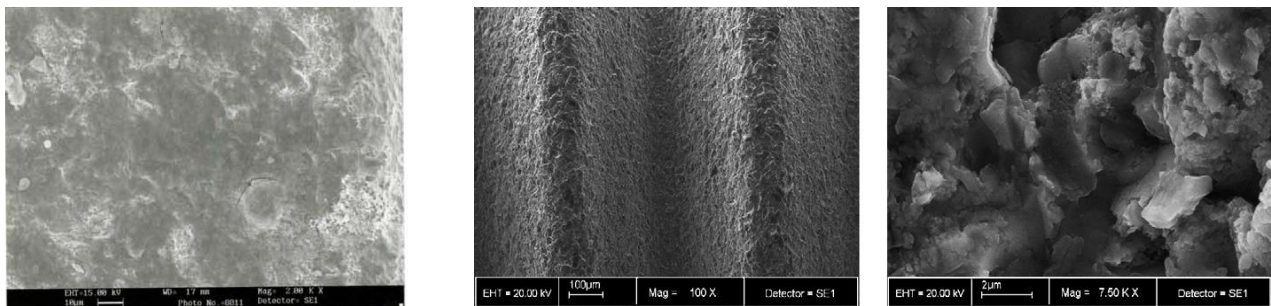
In questi trattamenti lo stato di partenza della superficie viene modificato chimicamente attraverso svariate tecniche, che comprendono tutte l'immersione dei campioni metallici in soluzione polare (organica o acquosa) di un composto chimico, la cui natura influenza la reattività del titanio [22]. Si precisa che gli acidi inorganici, rispetto a quelli organici, provocano modificazioni profonde. Con tali processi si ha un perfezionamento dei difetti morfologici, che vengono appiattiti.

#### 5.3.1 Attacco con acido e attacco alcalino

L'attacco con acido (*acid attack*), detto anche mordenzatura (*etching*) è un trattamento chimico sottrattivo che consiste nella rimozione, mediante l'uso di acidi, di una certa quantità di materiale dallo strato di base, con lo scopo di creare delle cavità di diametro variabile da  $0.5$  a  $2 \mu\text{m}$  [16]. L'immersione di un impianto in acido (soluzione acquosa non ossidante), a temperatura ambiente o superiore [22], crea una microrugosità che va ad influire direttamente sull'apposizione di osso attraverso il legame che si viene a creare tra la topografia superficiale e la fibrina che agisce nella guarigione ossea (la superficie è idrofila), cui segue l'adesione delle cellule [16]. Le superfici

attaccate con acido esibiscono solitamente delle irregolarità morfologiche più piccole (Fig. 5.4) rispetto alle sabbiate, soprattutto verticalmente [17].

HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> e HF sono gli agenti chimici più diffusi in questo tipo di trattamento, il quale aumenta l'area disponibile e trasforma una superficie anisotropa in una isotropa [18]. Avvengono difatti reazioni redox nelle quali il metallo si dissolve e viene sviluppato idrogeno, che aderisce in parte alla superficie [22]. Esempi di miscele usate sono HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HF/HNO<sub>3</sub>, solitamente applicate dopo la sabbiatura; una maggiore aggressività della miscela aumenta la finitura dei difetti, una minore determina una distribuzione di rugosità più precisa [22]. Con un doppio attacco acido (*double acid etched*) [23] oppure incrementando la dose di acido applicato non si ha un incremento significativo della rugosità.



**Figura 5.4:** A sinistra una superficie mordenzata (SEM 2000x), a destra ingrandimenti di superficie trattata in soluzione di acido fluoridrico.

All'analisi AFM [18] si può notare come, rispetto alle *machined*, le superfici mordenzate presentino valori di R<sub>a</sub> maggiori ed una risposta ossea migliore, mentre la densità ossea perimpianto sia simile. Rispetto agli impianti sabbiati, il *removal torque* è più alto: questo parametro risulta elevato anche nelle superfici TPS (che verranno analizzate dopo), rispetto alle quali il riassorbimento osseo è quasi nullo [18, 24].

Wennerberg et al. [18] hanno svolto un confronto tra superfici *machined*, *double-acid-etched*, rivestite in idrossiapatite e TPS: i valori di R<sub>a</sub> sono stati, rispettivamente, di 0.5, 0.7, 9 e 10 μm. Dai risultati, la rugosità intermedia delle superfici trattate con doppio attacco acido è buona, perché si colloca tra una leggermente inferiore e altre due superiori, ma troppo elevate per consentire una corretta osteointegrazione.

Anche per l'attacco con acido i risultati clinici non sono stati molto soddisfacenti, ma si può sicuramente dire che esso assicura una migliore risposta osseointegrativa rispetto alle *machined* e apporta ulteriori vantaggi per il contatto osso-impianto rispetto alle sabbiate, ad esempio contribuendo alla rimozione di impurità lasciate dal mezzo sabbicante [18,25].

I processi di mordenzatura sono in continuo perfezionamento (ad esempio il trattamento in soluzione di acido fluoridrico (vedi Fig. 5.4) ha dimostrato di incidere significativamente sulla differenziazione osteoblastica): nello specifico [18], essendo che possono indurre assorbimento di idrogeno da parte della superficie, si tenta di risolvere il problema rappresentato dall'indebolimento delle proprietà meccaniche del metallo, quindi da potenziali fratture (fragilità) e diminuite capacità di carico.

Anche le soluzioni alcaline, come NaOH, vengono impiegate in modificazioni di tipo chimico [22], ovvero in *attacchi alcalini*: l'elevato pH induce la formazione di gruppi -OH sullo strato di ossido, con una conseguente formazione di sali di titanio, i quali poi si dissolvono sotto forma di idrogel. Solitamente si opera ad alte temperature, per consentire la creazione di difetti sub micrometrici: la topografia iniziale subisce dei cambiamenti abbastanza profondi.

#### 5.4 SUPERFICI SLA

In seguito ai buoni risultati forniti dalle due tecniche sottrattive precedenti, si è pensato di unirne i vantaggi in un unico trattamento, al fine di ottenere una superficie SLA (*sandblasted and acid-etched*) [18]: la prima fase di sabbiatura consente di avvicinarsi molto ad una rugosità che determini un fissaggio meccanico forte, l'attacco acido perfeziona invece la conformazione topografica (smussa i picchi che si creano in seguito alla formazione delle microcavità) ed aiuta a promuovere l'adesione delle proteine, considerata fondamentale nelle fasi iniziali della guarigione ossea; aggiunge inoltre allo strato di ossido un ulteriore spessore di idruro di Ti, la cui specifica funzione resta ancora sconosciuta.

La superficie risultante non è la più ruvida che si possa avere (come in impianti rivestiti in HA o TPS), ma assicura una buona ritenzione meccanica che le morfologie anche più irregolari non favoriscono. I valori di  $R_a$  sono leggermente superiori a quelli di superfici sabbiate (Tab. 5.2): a tal proposito si ricorda però che in molti studi [18] i valori di questo parametro si rivelano più bassi rispetto alle previsioni anche per il fatto che le sperimentazioni vengono fatte su dischi trattati che *simulano* la superficie implantare, non sugli impianti stessi.

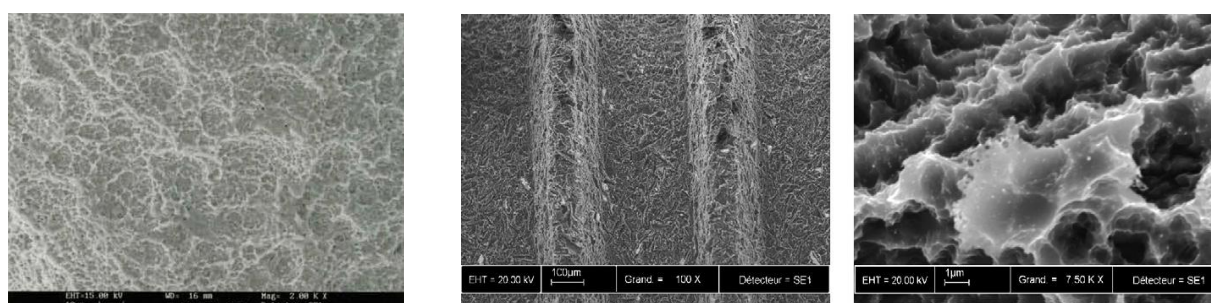
Quando si è tentato di sostituire la sabbiatura con la levigatura, si è avuto scarso successo; altre sperimentazioni si sono svolte in osso umano, e, come ci si aspettava, la risposta ossea è stata superiore in confronto a superfici lisce [18]. Si è visto anche che, rendendo la superficie idrofilica mediante l'immersione, per esempio, in NaCl, è possibile ottenere migliori risultati (questo per la seconda fase di lavorazione della superficie in questione) [18]. Rispetto alle sabbiate, i picchi di

queste superfici sono più regolari in altezza, mentre le depressioni sono più variabili come dimensione [15].

Una superficie SLA esplica dunque una maggiore integrazione con il tessuto, se paragonata ad una *machined*. I confronti con gli altri tipi di superficie non forniscono sempre delle valide argomentazioni per decretare la superiorità o l'inferiorità di questo tipo di impianti: è possibile comunque affermare che un trattamento così combinato consente di raggiungere una rugosità media (Fig. 5.5) ed una buona resistenza alla trazione, indispensabili per la stabilità del contatto osso-impianto.

MATERIALE	R <sub>a</sub> (μm)
Ti blasted (corundum 300-400 μm) and acid-attacked	1.80 ± 0.20
Ti6Al4V blasted (corundum 300-400 μm) and acid-attacked	2.30 ± 0.20
Ti6Al4V blasted (corundum 300-400 μm) and acid-attacked	2.10 ± 0.05

**Tabella 5.2:** Valori di rugosità per superfici in Ti SLA (tratto da [20]).



**Figura 5.5:** Ingrandimenti al SEM di superfici SLA.

## 5.5 TRATTAMENTI ELETTROCHIMICI

Un impianto sottoposto a processo elettrochimico viene immerso in una soluzione elettrolitica (non necessariamente acquosa) con sostanze ioniche oppure ossidanti e collegato al polo positivo di un circuito elettrico: la superficie funge così da anodo nel processo, controllato comunque da un'alimentazione esterna [22]. Inizialmente applicata all'alluminio, questa tecnica è stata poi estesa anche al titanio, con tre possibili varianti [22]: *l'elettro-erosione*, *l'elettro-levigatura* e *l'anodizzazione elettrochimica* (chiamata anche *ossidazione anodica*).

Nel primo caso si ha una fusione localizzata del metallo e la superficie viene resa abbastanza omogenea, nel secondo un perfezionamento dei difetti superficiali e nel terzo un ispessimento dello strato di ossido fino a circa 40 micron. Questa varietà di tecniche consente di progettare la rugosità desiderata a seconda dell'esigenza.

### 5.5.1 Anodizzazione elettrochimica

L'anodizzazione avviene in soluzione elettrolitica con acidi forti ( $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$ ,  $HNO_3$ , HF), ad una temperatura di 20-25 °C ed applicando un voltaggio di circa 80 V: si ottiene una crescita dello strato di partenza (a 180-200 nm, rispetto ai 5 nm dell'elettro-levigatura), con presenza di Ti e O ed eventuali contaminanti (carbonio), comunque rimuovibili con i lavaggi. Gli impianti anodizzati attualmente in commercio presentano una morfologia porosa (1-2 micron) (Fig. 5.6) ed uno spessore dello strato superficiale che può andare dai 2 ai 7 micron [22]. All'aumento del voltaggio imposto si ha una crescita del contatto osso-impianto e del parametro  $R_a$  [18].

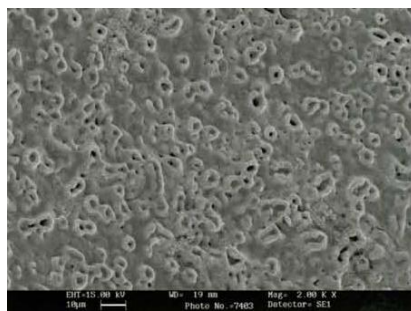


Figura 5.6: Superficie anodizzata con i caratteristici pori.

Oltre che ad alte tensioni, il processo può avvenire anche ad alte correnti ( $200 A/m^2$ ), con il risultato di un ispessimento dello strato di ossido a più di 1000 nm [16]: poiché quest'ultimo finisce per dissolversi lungo il percorso convenzionale della corrente e per addensarsi invece su altre regioni, si creano dei micro o nanopori (diametro variabile dalle decine a poche centinaia di nm [17]) sulla superficie. E' evidente la dipendenza del risultato da molti fattori (la densità di corrente, la concentrazione di acidi, la composizione e la temperatura dell'elettrolita): gli effetti sono modificazioni della microstruttura e della cristallinità dello strato di ossido, che si traducono in cambiamenti sia biomeccanici che biochimici [16].

E' forse scontato dire che questi impianti risultano superiori a quelli *machined* dal punto di vista della fissazione meccanica all'interfaccia (sia in studi su animali che in studi su osso umano), essendo che in una superficie così modificata sono presenti Ca o Mg, i quali aumentano l'osteoconduttività e innalzano i valori di  $R_a$  o  $S_a$ . Aggiungendo ioni all'elettrolita usato nel trattamento, la superficie diventa *bioattiva*, con conseguenti miglioramenti sotto l'aspetto integrativo e del *removal torque*. In alcune indagini si è inoltre notato che, accoppiando una superficie sabbata con una anodizzata si ottengono risultati positivi [18].

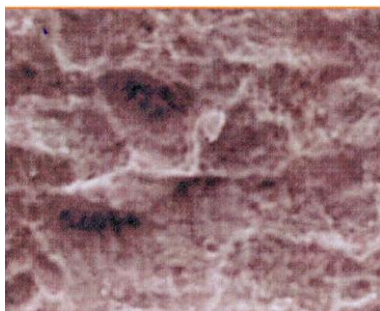
### 5.5.2 Superfici nanoporose anodizzate

Questo tipo di configurazione viene prodotta in seguito ad un processo di anodizzazione elettrochimica, che si rivela innovativo per la creazione di una morfologia nanostrutturata, la quale è finemente caratterizzata (Fig. 5.7). I risvolti di queste superfici si sono cominciati a studiare solo di recente su modelli animali (le sperimentazioni cliniche sono ancora poche).

La struttura porosa consente che, con il processo anodico, vengano a depositarsi sulla superficie dei fosfati con potere osteoconduttivo [12]; essi risultano inoltre legarsi chimicamente con gli ioni calcio e l'idrossiapatite dell'osso, quindi entrano in gioco anche nella fase di mineralizzazione, anche se ulteriori indagini sono necessarie per giustificare questa interazione e verificarne la validità.

Uno studio di Perrotti et al. (2004) [12] ha evidenziato le buone prestazioni degli impianti anodizzati rispetto a sabbiati: in questi ultimi la risposta nei tessuti molli perimplantari è buona fin dalle prime fasi dell'osteogenesi, ma nei nanoporosi vi è certamente una bioattività maggiore, ed una più alta percentuale di contatto osso-impianto (si veda Tab. 5.3), che però si nota solo a distanza di tempo (otto settimane). Alla fine del processo la formazione ossea c'è in entrambi, ma nei nanoporosi il nuovo tessuto è caratterizzato anche da una migliore continuità.

I vantaggi di queste superfici non vanno attribuiti soltanto alla rugosità data dai pori, che in molti casi risulta anche simile come valori ad altre tipologie di superfici, ma soprattutto all'influenza chimica dello strato anodizzato: a differenza di altri trattamenti (per esempio i rivestimenti semplici in idrossiapatite) che rendono la superficie altrettanto attiva ma che non ne assicurano la stabilità meccanica all'interfaccia, le nanoporose anodizzate offrono una buona ritenzione meccanica ed i pori sono controllati nelle dimensioni per consentire un efficiente trasporto di fattori e proteine utili al processo osteointegrativo.



**Figura 5.7:** Superficie nanoporosa anodizzata.

% contatto osso-impianto			
Tempo sperimentale	Impianti Test	Impianti Controllo	Valore di P
2 sett	22% ± 0.7	21.5% ± 0.9	0.308#
4 sett	42% ± 1.2	38.83% ± 2.5	0.019#
8 sett	65% ± 2.1	56.8% ± 2.5	0.001*

**Tabella 5.3:** Risultati dello studio di Perrotti et al. in merito al contatto osso-impianto (tratto da [12]).



## 5.6 METODI DI DEPOSIZIONE SUPERFICIALE E RIVESTIMENTI

Saranno presi in considerazione in questa sezione il metodo TPS (titanium.plasma-spray) ed i rivestimenti in idrossiapatite.

### 5.6.1 Il titanium-plasma-spray

Il *titanium plasma spray* (TPS) è una tecnica additiva che consente la creazione di una superficie irregolare mediante l'aggiunta di particelle di titanio: più precisamente, viene iniettato titanio in polvere in un forno al plasma ad alta temperatura. Le particelle si fondono così sulla superficie, formando uno strato uniforme (Figg. 5.8 e 5.9) che può raggiungere le decine di micron, la cui rugosità risultante aumenterà l'area di contatto fra impianto e superficie in modo significativo.

La morfologia tipicamente porosa di questa superficie espone dei picchi rotondi abbastanza distanziati tra loro, ma collegati, e cavità poco accentuate [15] (Fig. 5.10).



Figura 5.8: Micrografia di un rivestimento TPS.

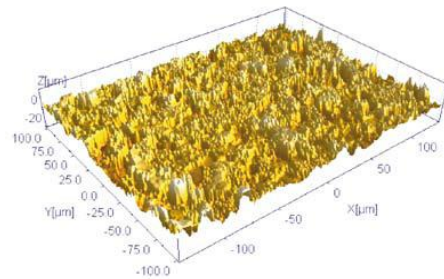


Figura 5.9: Immagine di profilo TPS ottenuta con interferometro ottico a radiofrequenza.

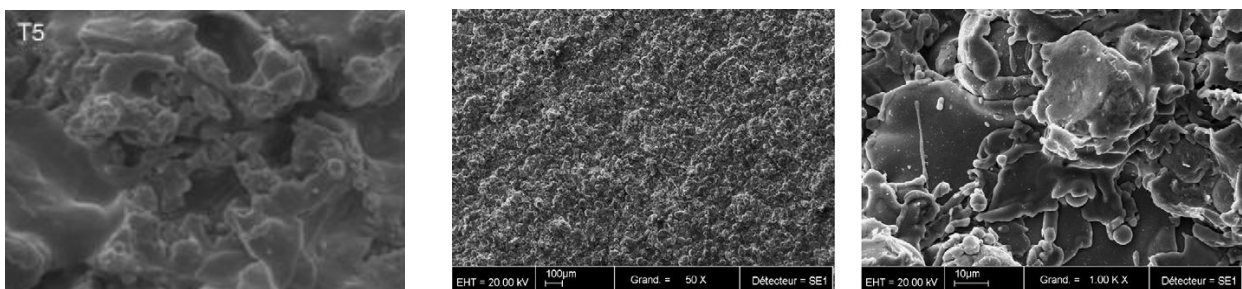


Figura 5.10: Ingrandimenti al SEM di superfici TPS.

I risultati degli studi condotti su queste superfici sono talvolta contraddittori: generalmente si riportano valori per i parametri di rugosità decisamente alti. Si osservano sulla superficie delle fessure tra i difetti globulari, non rinvenibili su impianti lisci, sabbati o mordenzati. Non sempre la maggiore rugosità ed irregolarità (quindi la maggiore complessità [22], che comporta un aumento



dell'area superficiale anche di un fattore dieci [15]) si traduce in un migliore contatto osso-impianto: dal punto di vista clinico le TPS causano infatti più riassorbimento osseo marginale rispetto ad altre superfici moderatamente ruvide o lisce. Si può quindi dedurre che un aumento di rugosità sia positivo per la ritenzione meccanica all'interfaccia, ma che un incremento eccessivo del valore (per le TPS si hanno valori di  $R_a$  che si aggirano spesso tra i 4 o 5  $\mu\text{m}$ , accettabili, e i 10  $\mu\text{m}$ , decisamente troppi), come spesso si verifica in questo tipo di impianti, arrechi più svantaggi che benefici, ed è anche per questa ragione che vengono piuttosto preferiti i rivestimenti in idrossiapatite.

Altro svantaggio del plasma-spray sono i residui metallici che si generano in seguito all'usura nel tempo dell'impianto, rinvenibili oltre che in sede, anche nel fegato, nella milza e nel sistema linfatico: gli effetti cancerogeni sono dannosi sia a livello locale che sistemico [16].

### 5.6.2 Rivestimenti con fosfati di calcio

L'arricchimento di tessuti perimplantari con *fosfati di calcio (idrossiapatite)* velocizza l'adesione degli osteoblasti e la guarigione ossea. La tecnica consiste nel deporre sostanze chimiche con diversi metodi: il plasma-spray, la deposizione a spruzzo (*sputter-deposition*), il rivestimento sol-gel, la deposizione elettroforetica, la precipitazione biomimetica [16].

Nella pratica il trattamento più diffuso risulta il *plasma-spray*: particelle di idrossiapatite vengono iniettate in un forno al plasma ad alta temperatura (tecnica già vista con il TPS), e vanno poi a fondersi nella formazione di un film superficiale che può arrivare al massimo ad uno spessore di pochi mm: si crea così una superficie con morfologia irregolare (Fig. 5.11). Proprio perché è un trattamento additivo, rispetto ad uno sottrattivo, presenta una maggiore spaziatura fra i difetti creati. Come nelle superfici TPS, si trovano qui gli stessi svantaggi rispetto a superfici più classiche come le sabbiate, anche se questi rivestimenti si sono rivelati leggermente migliori delle TPS. I risvolti clinici hanno difatti dimostrato che, nonostante il rivestimento in HA abbia un potere osteoconduttivo molto alto nell'attivazione di interazioni strette tra impianto e tessuto biologico (nel quale viene convertita nella forma più stabile di fluoro apatite [22]), può comunque rilasciare nel tempo dei residui. L'uso di questa tecnica rimane perciò limitato in campo odontoiatrico, mentre risulta più diffuso in ortopedia.

Per evitare gli inconvenienti dei rivestimenti sopra descritti, si ricorre spesso ad altre tecniche, come la precipitazione biomimetica dei fosfati attraverso immersione in SBF (*simulated body fluids*), che comporta lo sviluppo, in condizioni di temperatura e pH fisiologici, di cristalli simili a

quelli del tessuto osseo. Rispetto a quelli ad alta temperatura, questi rivestimenti (Fig. 5.12) sono maggiormente solubili nei fluidi biologici e riassorbibili dagli osteoclasti in forma di dentina, in quanto rispecchiano il naturale processo di mineralizzazione [16].

In Tabella 5.4 si riportano (da [22]) alcuni valori di rugosità per superfici sabbiate e rivestite in HA.

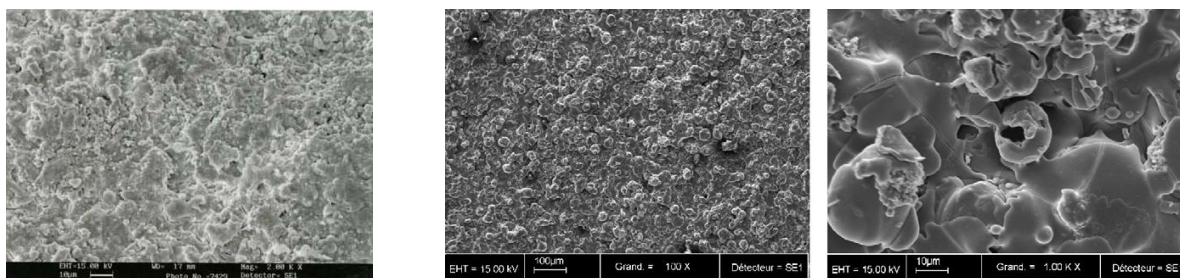


Figura 5.11: Immagini al SEM di superfici rivestite in idrossiapatite.

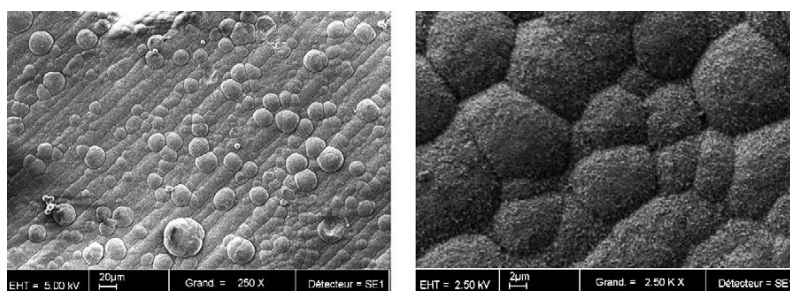


Figura 5.12: Immagine al SEM di un rivestimento biomimetico con fosfati di calcio.

MATERIALE	R <sub>a</sub> (μm)
Ti blasted with rutile	1.3
Ti blasted with rutile and HA-coated (0.1 μm)	1.3
Ti blasted with rutile and HA-coated (1 μm)	1.4
Ti blasted with rutile and HA-coated (4 μm)	2.1

Tabella 5.4: Valori di rugosità per superfici in Ti sabbiate e con rivestimento in HA (tratto da [22]).

## 5.7 TECNICHE DI MODIFICAZIONE BIOCHIMICA

I trattamenti biochimici, di più recente introduzione, si propongono di influenzare direttamente gli avvenimenti all'interfaccia osso-impianto, pur essendo che manca ancora una comprensione completa dei processi cellulari e molecolari che si verificano in tale sede. Aggiungendo determinate biomolecole che si rinvengono sulla matrice e sulla membrana cellulare (fattori di crescita e proteine di adesione), la superficie viene resa *bioattiva*: i rivestimenti sono supposti essere in grado di stimolare una corretta formazione ossea attraverso la creazione di una

topografia controllata ed ottimizzare l'osteointegrazione a lungo termine. Poiché risulta difficile l'incorporazione di una proteina intera, si usa una tecnica (*peptide-mimicry*), nella quale si identificano sequenze biologicamente attive stabili, solubili e facilmente riproducibili dal punto di vista chimico, appartenenti a proteine più lunghe (peptidi bioattivi).

Le tecniche di trattamento per quanto riguarda i metalli sono tre [22]:

- *Adsorbimento fisico-chimico* della molecola attiva sulla superficie: è l'approccio più semplice. Si immerge il metallo in soluzione di peptide bioattivo, senza però avere un controllo preciso della sua deposizione; di conseguenza non si può determinarne la giusta quantità che consenta l'effetto di interazione voluto; non ci si può accertare nemmeno sulla distribuzione delle molecole, che possono anche allontanarsi dal sito.

- *Legame covalente* (diretto o tramite distanziatore): si lega covalentemente il peptide alla superficie sfruttandone le proprietà già presenti inizialmente ed utilizzando solitamente gruppi reattivi -OH, la cui quantità può essere incrementata con diverse strategie, come i rivestimenti superficiali in oro [22]; anche con questa tecnica non si ha un buon controllo della quantità di peptide adsorbito.

- *Inclusione di una molecola attiva in un trasportatore*, che funge da materiale di rivestimento alla superficie: qui si ha un controllo soddisfacente della densità del peptide; esempi di trasportatori nei quali le molecole sono impregnate o legate alla struttura, e che non suscitano reazioni sfavorevoli nel tessuto in quanto biocompatibili e biorisorbibili, sono gli acidi polilattico e poliglicolico e gli idrogel.

#### Un esempio di rivestimento con fattori di crescita

Un miglioramento del processo di guarigione ossea a livello locale viene ottenuto con rivestimenti con fattori di crescita, quali il *fattore di crescita trasformante* (TGF- $\beta$ ), le *proteine morfogenetiche dell'osso* (BMPs), il *fattore di crescita derivato dalle piastrine* (PDGF), il *fattore di crescita dell'endotelio vascolare* (VEGF), il *fattore di crescita dei fibroblasti* (FGF) e i *fattori di crescita insulino-simili* (IGF-1 e 2) [16].

Le BMPs riescono a stimolare l'osteogenesi anche in regioni distanti dal sito dove è avvenuto l'innesto e influenzano il reclutamento degli osteoclasti nella fase di rimodellamento, anche se un loro limite è che devono essere rilasciate progressivamente nel tempo. Si ricorda poi il bFGF (*fattore di crescita di base dei fibroblasti*), che promuove la replicazione delle cellule osteoprogenitrici e degli osteoblasti, e la glicoproteina (VEGF)<sub>165</sub> (specie molecolare dominante

del VEGF che stimola l'angiogenesi). In uno studio di Mueller et al.(2011) [26] si è indagata l'influenza di un rivestimento che combina questi tre fattori con il collagene su una superficie precedentemente attaccata con acido, e lo si è confrontato con impianti rivestiti in solo collagene: si è potuta però rilevare la sola azione benefica del collagene (aumenta l'espressione dell'osteocalcina e promuove una migliore formazione ossea), mentre gli altri fattori hanno a volte compromesso l'interazione osso-impianto. Tuttavia altri studi simili hanno dimostrato il contrario: si vede quindi come in questo campo non ci sia ancora oggettività nei risultati (gli studi clinici in merito non sono stati finora sufficienti) e che non sia possibile trarre con certezza delle conclusioni.

### *I bifosfonati*

La superficie implantare può essere trattata anche con i *bifosfonati*, farmaci anti-riassorbimento osseo che controllano il rimodellamento e sono utili nei casi clinici in cui la quantità di osso è insufficiente, in quanto promuovono l'aumento della densità ossea attorno all'impianto. Il loro rilascio deve essere controllato e deve avvenire a temperatura ambiente, data l'affinità per le superfici in fosfato di calcio.

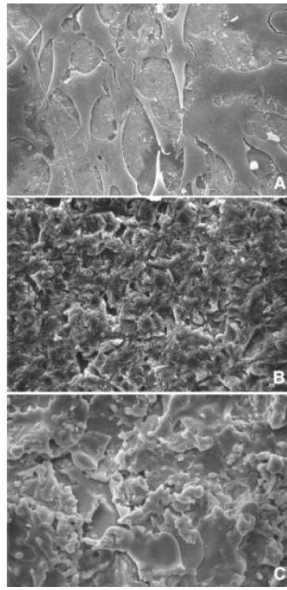
## **5.8 COMPORTAMENTO DELLE CELLULE SAOS-2 SIMIL-OSTEOBLASTICHE SU DIVERSE SUPERFICI IN TITANIO: PROLIFERAZIONE, ADESIONE E DIFFERENZIAZIONE CELLULARI**

Come visto nel capitolo precedente, le superfici più ruvide favoriscono una migliore interazione del tessuto osseo con l'innesto, poiché modulano in modo efficiente la crescita, lo sviluppo e la differenziazione nel processo di guarigione ossea.

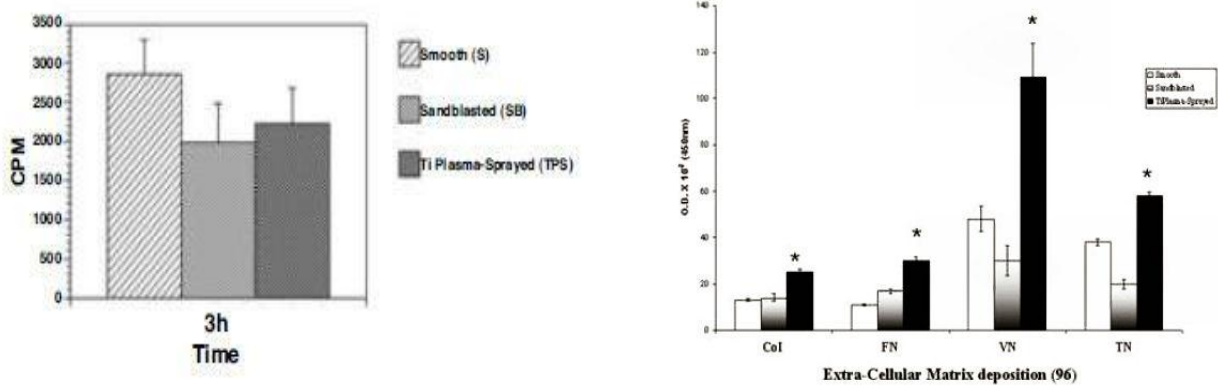
Si ricorda che all'interfaccia osso-impianto si verifica un complesso fenomeno che comprende la migrazione, l'attacco (Fig. 5.13) e la proliferazione degli osteoblasti. Nello specifico, durante la *fase proliferativa*, vengono espressi istoni e cicline, proto-oncogeni e proteine della matrice. In seguito la proliferazione cellulare cala e vengono stimolati i geni relativi alla sintesi della ECM (fosfatasi alcalina, MGP). Nella fase di *mineralizzazione* agiscono le proteine osteopontina e osteocalcina. I fattori più importanti del *differenziamento* sono invece ormoni (glucocorticoidi) e fattori di sviluppo (TGF- $\beta$ ), oltre alle componenti della ECM prodotte dagli osteoblasti, quali *collagene tipo I* (Coll I), *fibronectina* (FN), *vitronectina* (VN), *tenascina* (TN). Per quanto riguarda le proteine FN e VN, la prima è una componente connettiva che collega il citoscheletro alla matrice e il collagene ai proteoglicani, mentre la seconda è più attiva nella guarigione ossea e si trova anche nella dentina.

Uno studio di Postiglione et al. (2004) [27] ha permesso di esaminare diverse superfici implantari dal punto di vista dell'espressione fenotipica di una particolare linea cellulare simil-osteoblastica, le *cellule SaOS-2*. Sono cellule di osteosarcoma umano che rappresentano un buon modello di studio del comportamento sia in vitro che in vivo degli osteoblasti. Le superfici analizzate al SEM e preventivamente sterilizzate presentano una rugosità progressivamente maggiore: lisce, sabbiate e titanium-plasma-spray (TPS). Le lisce sono molto regolari; al contrario, nelle sabbiate si alternano piccoli solchi e picchi non pronunciati; le TPS sono le più irregolari, con cavità più vaste, picchi più pronunciati e scanalature. Per quanto riguarda la distribuzione delle SaOS-2, esse formano un unico strato piatto e continuo sulle superfici lisce, mentre sulle altre due sono caratterizzate da discontinuità fornita da multistrati di cellule di forma irregolare dotate di filopodi (Fig. 5.13). Questi risultati indicano una tendenza, da parte delle cellule simil-osteoblastiche, ad adattarsi nel miglior modo possibile ai cambiamenti di rugosità. Per quanto riguarda l'espressione fenotipica delle SaOS-2, proteine come l'osteopontina (nella parte mineralizzata della matrice), risultano espresse maggiormente sulla membrana delle cellule di superfici sabbiate o TPS. Anche la concentrazione di Col I, FN e TN è più marcata in queste due superfici, tanto che vengono sintetizzate, secrete e organizzate, cosa che non succede sulle lisce (lì rimangono in sospenso nel citoplasma) (Fig. 5.14).

Si può dunque affermare che le superfici meno regolari inducono maggiormente il differenziamento cellulare, e, sulla base di questo, è possibile supporre una migliore osteointegrazione in vivo per gli impianti più ruvidi, sebbene bisogna tener conto dei risultati spesso contraddittori che le sperimentazioni in vivo forniscono in virtù della complessità di fattori incidenti sul processo e delle problematiche del follow-up. Ci si limita quindi a riconoscere in vitro l'influenza positiva, a favore di una formazione ossea di successo, di una proprietà di superficie come la rugosità sul comportamento e sulla risposta degli osteoblasti, in particolare sulla loro proliferazione e differenziazione, ma non in modo rilevante sulla loro adesione.



**Fig. 5.13:** Adesione delle SaOS-2 su superfici lisce (A), sabbiate (B), TPS (C) (immagini al SEM tratte da [27]).



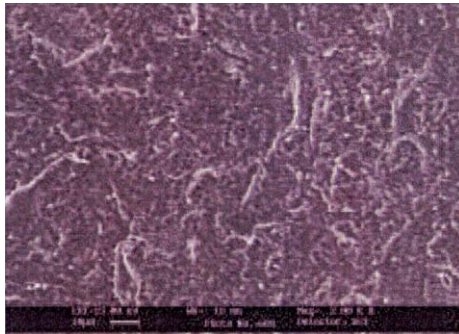
**Figura 5.14:** A sinistra: Adesione delle SaOS-2 a differenti superfici dopo 3 ore (non si notano grosse differenze); a destra: sintesi delle componenti della matrice extracellulare (analisi dei risultati dopo 96 ore) (tratte da [27]).

## 5.9 LE SUPERFICI NANOSTRUTTURATE

La superficie *nano strutturata* (Fig. 5.15) è un'innovazione abbastanza recente nel campo implantare: essa è per definizione caratterizzata da una rugosità inferiore al micron (dimensione dei corpi cellulari) e con pori larghi circa 100 nm, ottenibile con diversi trattamenti, che devono fornire comunque il valore desiderato di rugosità.

Morra et al. (2004) [14] hanno compiuto uno studio importante sugli impianti in titanio nanostrutturati per analizzare i vantaggi apportati da una tale morfologia. Si è prima presa in considerazione la relazione tra il trattamento subito e il risultato qualitativo ottenuto; in seguito si è valutata l'eventuale introduzione di residui tossici. L'analisi XPS ha fornito una descrizione dello strato superficiale di ossido per un piccolo spessore, quindi la composizione chimica dello strato

più esterno. Anche quando il titanio presenta poche impurezze, la superficie implantare assorbe inevitabilmente delle molecole di carbonio atmosferico o provenienti dai processi di lavorazione. E' quindi necessario distinguere il carbonio dall'atmosfera e quello da decontaminazione, ponendo come normale una percentuale del 30-40%: nel caso delle superfici studiate i valori rientrano nella norma, dato che nella sperimentazione non si sono modificate né la morfologia né la chimica superficiale.



**Figura 5.15:** Esempio di morfologia nanostrutturata.

Per le prove di citotossicità il titanio è risultato naturalmente non tossico, al contrario di alcuni materiali che possono lasciare residui tossici sullo strato di cellule che aderiscono all'impianto, compromettendone la citocompatibilità. Poiché le cellule osservate sulla superficie non presentano problemi, si può affermare che soltanto la morfologia e la composizione chimica dello strato, non la presenza di tracce indesiderate, possono controllare l'interazione tra vite e osteoblasti.

Nel momento in cui la vite presenta un coagulo, le cellule si muovono attraverso di esso, difatti le superfici con morfologia più fine come le nanostrutturate sono maggiormente ritentive al coagulo rispetto alle levigate, velocizzando così la guarigione del sito implantare. Si è notato però che le superfici porose, ma sporche e con poca bagnabilità al sangue, non permettano il riempimento dei pori e originano una morfologia discontinua, svantaggio sempre più evidente man mano che i pori sono più piccoli.

Se si rimuove il coagulo dalla superficie nanostrutturata, è possibile osservare la presenza di piastrine appiattite su di essa e di fibre aventi diametro simile a quello dei pori, a conferma di una giusta scelta nel ridurre la rugosità al livello dei corpi cellulari, discorso che invece non è valido per le superfici lisce, le quali mostrano un'attivazione piastrinica minore.

La conclusione più importante che si può trarre da questa indagine sulle superfici nanostrutturate è che mostrano un'adesione e una crescita cellulare maggiori delle superfici lisce, sulle quali le

cellule riescono ad aderire, ma mantengono una forma globulare e con filopodi, a dimostrazione del fatto che il processo di appiattimento deve ancora avvenire. Dal momento che nelle nanostrutturate la colonizzazione avviene interamente e che i filopodi riescono ad individuare elementi morfologici delle loro dimensioni, si può dedurre che la loro rugosità superficiale influenzi la morfologia cellulare.

## 5.10 LA TECNOLOGIA MICROARRAY

A sostegno delle indagini riguardanti le modificazioni superficiali influenti sulla risposta cellulare, si ricorre spesso alla tecnologia molecolare *microarray*, la quale consente, in un sistema cellulare, l'analisi parallela dell'espressione di un numero molto grande di geni: è un'analisi qualitativa, in quanto differenzia ogni singolo gene, ma anche quantitativa, cioè in grado di rilevare cambiamenti nel livello di espressione delle cellule esaminate se queste vengono confrontate con campioni di riferimento [11]. La generazione di una sorta di "ritratto genetico" avviene confrontando l'RNA delle cellule d'interesse e un RNA di riferimento (previa trascrizione inversa mediante tinte fluorescenti, Cy5 per il primo, Cy3 per il secondo), successivamente ibridati a *microarray cDNA*. I campioni vengono poi visualizzati: la convenzione indica i geni che aumentano l'espressione nelle cellule esaminate (*up-regolati*) con il rosso, quelli che la decrementano (*down-regolati*) con il verde, mentre i geni con simile livello di espressione con il giallo.

Carinci et al. (2004) [11] hanno condotto uno studio sulla risposta, a livello di variazioni nell'espressione genica, delle *cellule simil-osteoblastiche MG63* a due superfici implantari, lisce e nano porose (queste ultime, avendo molti pori, presentano una buona rugosità). Usando *DNA microarray* contenenti quasi 20000 oligonucleotidi, si sono potuti identificare parecchi geni le cui espressioni sono state significativamente *down-regolate* e aventi diverse funzioni, oltre ad alcuni geni con funzione ignota. Si è visto che una superficie nanoporosa può *down-regolare* l'espressione dei geni, in particolare può modulare positivamente l'immunità, il trasporto vescicolare (endocitosi ed esocitosi delle componenti della matrice extracellulare) e l'apoptosi. Per quanto riguarda la *down-regolazione* dell'immunità, si ha probabilmente il riconoscimento dell'innesto come proprio: il comportamento delle cellule a livello di geni non viene alterato dall'interazione tra di esse e la superficie, tanto che il titanio risulta del tutto accettato e non viene percepito come materiale incompatibile. Regolare il trasporto e l'apoptosi significa invece apporre delle modifiche nel ricambio della matrice extracellulare e nella proliferazione degli osteoblasti.



Le osservazioni che è possibile condurre con l'ausilio delle tecnologia descritta consentono una maggiore comprensione dell'osteointegrazione a livello molecolare, anche se ulteriori indagini risultano necessarie per avere una visione più completa degli eventi dell'intero processo.

### 5.11 LE SUPERFICI DIFFERENZIATE

Gli impianti in titanio con *superficie differenziata* sono stati progettati allo scopo di combinare prestazioni differenti e raccogliere in un solo prodotto i vantaggi di tre morfologie, fatto che ha permesso di rafforzare e perfezionare non poco la risposta ossea dopo il loro innesto. Essi presentano tre porzioni (Fig. 5.16) rispecchianti i trattamenti superficiali subiti [10]:

- un collo liscio, il quale inibisce l'accumulo di batteri;
- una superficie intermedia sabbiata;
- una parte inferiore in plasma-spray, che, incrementando la superficie di un fattore 20-40, garantisce un buon incastro fra osso e impianto.



**Figura 5.16:** Una vite a superficie differenziata.

Da una sperimentazione condotta da Scarano et al. [10] è stato possibile confrontare le superfici differenziate con impianti uguali in grandezza e forma ma semplicemente sabbiati: i risultati, riportati a distanza di 2, 6 e 8 settimane attraverso un'attenta analisi istomorfometrica, hanno valutato la percentuale di contatto fra osso e impianto e le caratteristiche dell'osso neoformato (Fig. 5.17).

Nelle prime fasi della guarigione non si sono rilevate sostanziali differenze dal punto di vista della risposta degli osteoblasti: entrambi i tipi di impianti dimostrano infatti una buona densità ossea, ed è per questo motivo che la sperimentazione ha permesso di dimostrare la non correlazione tra densità ossea perimplantare e rugosità superficiale. Da notare che nelle superfici differenziate la porzione sabbiata determina una migliore guarigione ossea nell'osso corticale, la cui rigenerazione è notoriamente meno rapida. La parte in plasma-spray consente inoltre che il processo di

rimodellamento avvenga con la presenza di cellule multinucleate che non determinano effetti infiammatori. Intorno all'impianto è presente osso maturo e compatto e non si riscontra matrice non ancora mineralizzata.



**Figura 5.17:** Istologia di un impianto differenziato a 2,4 e 8 settimane (tratto da [10]).

Nonostante questo studio non abbia evidenziato grandi novità a favore degli impianti differenziati dal punto di vista della densità ossea perimplantare, si può concludere che essi comportano sicuramente un'integrazione notevole tra l'epitelio, il tessuto connettivo e l'osso (tessuti attorno all'impianto), con la precisazione che il connettivo della superficie considerata differisce dal dente naturale nella distribuzione delle fibre connettivali, che si dispongono parallele o perpendicolari fra loro a seconda della porzione di impianto con cui si trovano a contatto (nel dente sono invece perpendicolari alla superficie) ed esibiscono uno strato di proteoglicani che si interpone fra di esse e la superficie. Le fibre collagene, come anche i fibroblasti, dimostrano quindi di sapersi orientare funzionalmente alla superficie, ad indicare che il trattamento può incidere considerevolmente sulla loro disposizione: nel caso delle superfici differenziate, è la porzione rivestita in plasma-spray quella che esplica questa capacità.

## **5.12 IL PROBLEMA DELLA DECONTAMINAZIONE BATTERICA**

Il successo a lungo termine degli impianti può venire seriamente compromesso da infezioni batteriche che inducono *malattie periimplantari*, ovvero "patologie che colpiscono i tessuti molli e duri di supporto implantare" [28]. Dal punto di vista clinico, i processi infiammatori che colpiscono i tessuti perimplantari si manifestano in due forme: la *mucosite* e la *periimplantite*. La prima, che colpisce i tessuti molli, può essere risolta anche completamente dal punto di vista della guarigione; la seconda, che colpisce anche i tessuti duri, è un'infezione più grave, in quanto si concretizza nel

riassorbimento. La causa primaria di queste patologie risiede nell'accumulo persistente di batteri Gram-negativi in sede sub e sottogengivale, che distruggono i tessuti attorno all'impianto. Un tessuto connettivo come quello perimplantare resiste poco agli attacchi dei batteri, che riescono quindi a penetrare nei tessuti duri. Il trattamento di suddette patologie si basa principalmente sul controllo dell'infezione e sulla rigenerazione ossea, che di prassi comprendono il *debridement* locale, la terapia antibiotica e antisettica, l'aggiustamento occlusale, e soprattutto la terapia chirurgica resettiva, la quale ha come scopo la decontaminazione e viene scelta in base alla forma del difetto. Se nella procedura si usano per esempio acidi organici (acido citrico), i residui non vengono eliminati del tutto dall'impianto, e può succedere anche che lo stesso venga alterato. Per ovviare a questo inconveniente, si è attualmente molto diffuso in applicazioni implantari l'uso del *laser*.

#### **5.12.1 Uso in vitro del laser ERL**

Nell'ultimo decennio numerose indagini hanno dimostrato l'efficacia della decontaminazione in vitro tramite un particolare tipo di laser, il *laser Er:Yag (ERL)*, sperimentato inizialmente su diversi impianti in precedenza contaminati con *Streptococcus sanguis* [28]. Il potere decontaminante di tale laser è stato ulteriormente confermato anche nel caso in cui le superfici vengano riscaldate oltre misura. Successivi studi su animali hanno persino mostrato neoformazione ossea in caso di lesioni perimplantari indotte sperimentalmente, mentre un unico studio in vivo [28] si è occupato di periimplantiti gravi, riuscendo a rimuovere quasi del tutto la carica batterica senza danni termici e con buoni risultati degli indici di sanguinamento fino a sei mesi.

Se applicato ad impianti non contaminati, il laser stimola l'adesione e l'attacco delle cellule osteoblastiche, oltre a promuovere l'eliminazione dei residui in maniera proporzionale alla dose di radiazioni applicate. Purtroppo non si hanno invece dati definitivi a riguardo degli impianti contaminati, a parte un interessante studio italiano del 2008 (Quaranta et al.) [28], che ha ristretto la valutazione al caso in vitro. Tre diverse tipologie di impianto, macchinati, TPS, elettromordenzati-acidificati, sottoposti a decontaminazione ERL, sono stati analizzati dal punto di vista delle modifiche di superficie, con lo scopo di valutare la capacità del laser nella rimozione di biofilm batterici. Ogni tipo di superficie implantare ha preso in considerazione impianti sperimentali, infettati e poi decontaminati con ERL, ed impianti di controllo, solamente infettati. La contaminazione è avvenuta attraverso il microrganismo *Porphyromonas gingivalis*, un microbo con grado di adesione alto ai tessuti e che causa spesso periimplantiti. Data l'assenza di alterazioni

superficiali sia sugli impianti infettati che su quelli decontaminati, non ci sono differenze sotto questo punto di vista tra di essi. La decontaminazione è inoltre funzionale al tipo di superficie implantare (il potere decontaminante è risultato del 76.2% per gli impianti macchinati, del 90.9% per i TPS e del 98.3% per gli elettromordenzati-acidificati). Negli impianti non trattati sono invece presenti microrganismi visibili al SEM.

Il fatto che il laser ERL non alteri nessuna superficie nella rimozione dei batteri risulta ragguardevole se si rapporta questa sua capacità con gli strumenti tradizionali, che al contrario, modificando la morfologia, favoriscono l'adesione di microrganismi patogeni. Si precisa che la diminuzione dei batteri non è completa, ma più si prolunga il periodo di trattamento, più essi calano. Un'irradiazione ripetuta in più sedute potrebbe probabilmente portare ad un risultato quasi ottimale. L'adozione di uno strumento non troppo complicato come il laser ERL in aggiunta ai metodi di decontaminazione manuali e meccanici viene dunque incoraggiata in virtù della sua dimostrata biocompatibilità.

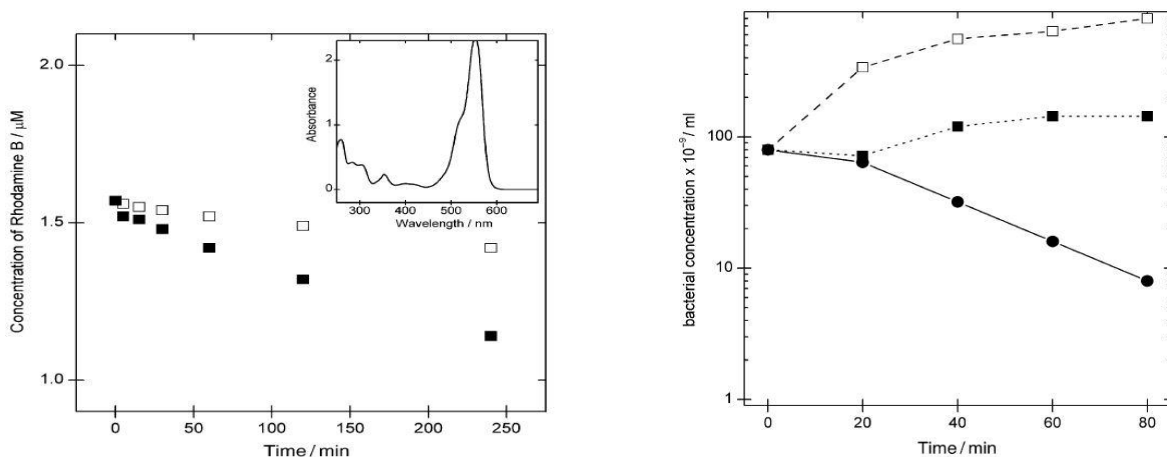
### **5.12.2 Sterilizzazione di impianti con radiazioni UV a bassa intensità**

Per ottenere un'efficace pulizia delle superfici implantari vengono richiesti laser ad alta intensità e potenza, in quanto garantiscono maggiore riflettività e veloce dispersione dell'energia termica. Sebbene i laser infrarossi soddisfino questi requisiti, danneggiano seriamente la superficie, fatto non trascurabile ai fini di una buona osteointegrazione.

Una valida alternativa a questo inconveniente consiste nel sensibilizzare la superficie dell'innesto con una sostanza colorante: essa, essendo una molecola organica, assorbe l'illuminazione proveniente dal laser ed usa l'energia ricavata per produrre agenti chimici altamente reattivi che attaccano i batteri. Per esempio, quando il colorante toluidina [29] viene colpito da una radiazione, reagisce con l'ossigeno atmosferico originando ossigeno molecolare, il quale risulta altamente reattivo e tossico per i batteri. Essendo che i coloranti mostrano di assorbire efficacemente la luce e di consentire un alto rendimento nelle reazioni che si vengono a creare, la sterilizzazione di impianti può essere guidata con danneggiamenti quasi nulli da radiazioni laser a bassa intensità, risolvendo quindi il problema dato da quelle a infrarossi. Bisogna precisare che, essendo questo campo aperto a continue sperimentazioni, il metodo menzionato non viene ancora largamente adottato.

L'ossido di titanio che ricopre la superficie di molti impianti diffusi in commercio è nanostrutturato: proprio su questo tipo di ossido Riley et al. (2005) [29] hanno condotto uno

studio, ai fini di valutare la sua foto-attività nell'eliminazione dei batteri una volta illuminato con raggi UV a bassa intensità. Lo strato di  $\text{TiO}_2$  in questione, già eccellente dal punto di vista della biocompatibilità, oltre che molto reattivo e resistente alla corrosione, viene reso nanostrutturato mediante sabbiatura seguita da attacco acido o plasma-spray. Viene così promossa la sua bioefficacia e, se illuminato da raggi UV, produce radicali liberi reattivi, che, una volta coinvolti in reazioni redox, possono eliminare i batteri. Per testare la foto-attività degli impianti si è studiata la decomposizione foto-indotta della *Rodamina B*, molecola di colorante che può reagire con i radicali ossidrilici: in presenza di un innesto dentale, si evidenzia un calo della concentrazione del colorante in funzione dell'aumento del tempo di illuminazione, chiaro segno della foto-attività dell'ossido (Fig. 5.18). Tra l'ossido e il colorante avviene una foto-reazione complessa, che comprende l'assorbimento di raggi UV da parte del  $\text{TiO}_2$  (che porta un elettrone in banda di conduzione e una lacuna in banda di valenza) e il trasferimento di un elettrone da parte del colorante, una volta adsorbita la luce, all'ossido; segue poi un processo denominato sensibilizzazione. I radicali prodotti da questa doppia reazione reagiscono con i batteri e si esauriscono con essi. Anche rispetto ad un impianto in soluzione batterica ma tenuto all'oscuro da radiazioni, un campione illuminato con UV poco intensi dimostra una forte diminuzione dei batteri.



**Figura 5.18:** A sinistra: la concentrazione di Rodamina B in funzione del tempo di illuminazione (i quadrati più scuri indicano la presenza di impianti, quelli più chiari l'assenza; l'inserto mostra lo spettro di assorbimento degli UV da parte della Rodamina B). A destra: concentrazione dei batteri in soluzione in funzione del tempo (pallini scuri: presenza di impianti e irraggiamento UV; quadrati bianchi: presenza di impianti, ma senza irraggiamento UV; quadrati neri: assenza di impianti, ma irraggiamento UV) (tratti da [29]).

La validità di queste indagini in vitro suggerisce che l'illuminazione di superfici implantari con luce UV a bassa intensità risulta vantaggiosa per la pulizia degli impianti e nella prevenzione delle infezioni batteriche. Sperimentazioni in vivo volte a verificarne l'effetto sulla salute a lungo termine dei pazienti sono in via di sviluppo.

### 5.12.3 Il plasma freddo di Argon

Per pulire le superfici da residui grassi dei processi di lavorazione, si usa anche la tecnica del plasma freddo di Argon (il plasma è un gas ionizzato del tutto o in parte): gli impianti da decontaminare vengono posti in una *camera bianca* con argon (Fig. 5.19) che, eccitato da un campo elettrico, si scinde in ioni ed elettroni, ed emette un fascio luminoso caratteristico. La superficie viene così sterilizzata da tutte le più piccole tracce indesiderate dei trattamenti subiti in precedenza, il tutto sempre sotto un attento controllo da parte dell'operatore. L'argon è un gas inerte in grado di penetrare in cavità molto piccole alle quali solitamente le molecole liquide non riescono ad avere accesso (le cavità sono presenti in molte superfici caratterizzate da una certa rugosità) [30]. Gli atomi degli elementi inerti sono più piccoli, quindi in grado di "fornire" una nube di elettroni abbastanza grande, e l'argon, in questo senso, risulta il migliore. Questo sistema di decontaminazione non modifica inoltre le proprietà superficiali, rendendo anzi la superficie maggiormente osteoconduttiva.



**Figura 5.19:** Decontaminazione al plasma freddo di argon.

## CONCLUSIONI

Nelle indagini tese a promuovere l'osteointegrazione attraverso trattamenti per migliorare la stabilità a lungo termine di un impianto, si è potuto vedere come si riescano ad ottenere vantaggi significativi considerando in maniera complessiva i fattori che agiscono nei vari *step* del processo.

Una superficie con livello di rugosità superiore ad impianti lisci o *machined* induce sicuramente una risposta ossea più forte ed incoraggia positivamente i fenomeni, sia a livello cellulare che molecolare, di guarigione dei tessuti. Si ponga però attenzione all'entità dell'irruvidimento: si è potuto verificare che una rugosità moderata (viene suggerito un valore di rugosità in ampiezza  $R_a$  di 1.5  $\mu\text{m}$ ) non comporta solitamente l'insuccesso dell'integrazione, mentre una rugosità troppo alta (per esempio nelle superfici TPS) non sempre si traduce in buone prestazioni.

Uno stesso trattamento può fornire risultati differenti: per esempio, nella sabbiatura incidono fortemente la natura e la granulometria delle particelle abrasive.

Un'opportuna ritenzione meccanica a livello interfacciale si può notare con trattamenti che combinano più tecniche: le superfici SLA rappresentano una soluzione appropriata degli (seppur non eccessivi) svantaggi dei singoli trattamenti di sabbiatura e di attacco con acido (per esempio si riducono i contaminanti lasciati dal mezzo sabbicante), in quanto consentono di innalzare la percentuale di adesione di proteine (fase di guarigione) e garantiscono un legame forte su scala micrometrica fra cellule del tessuto osseo e superficie implantare.

Hanno riscosso molto successo anche le morfologie su scala nanometrica, solitamente ottenute con anodizzazione elettrochimica e che, grazie alla loro configurazione, promuovono in modo più rapido l'adesione e la proliferazione osteoblastica. Anche la fissazione a livello meccanico risulta buona per queste superfici, vantaggio che invece si ritrova in maniera minima nei trattamenti di rivestimento TPS oppure con fosfati di calcio: essi favoriscono la creazione di una topografia in grado di guidare bene i segnali biochimici che danno avvio all'osteointegrazione, grazie all'arricchimento dello strato di base con elementi bioattivi, ma non assicurano un forte e stabile contatto fra osso e impianto. Per questo motivo si ricorre sovente alla combinazione fra rivestimento ed sabbiatura, o comunque a un trattamento che risolva l'inconveniente esposto mantenendo l'osteococonduttività del substrato.

Da queste considerazioni si deduce che vengono spesso privilegiati impianti con diverse caratteristiche (un esempio sono quelli a superficie differenziata), in modo che una porzione possa

sopperire alle inefficienze dell'altra, e la cui configurazione è pensata anche in vista del tipo di tessuto biologico con cui si stabilisce l'interazione.

Altrettanto importanti sono i procedimenti di decontaminazione basati su tecnologia laser, poiché assicurano l'eliminazione dei residui tossici senza apporre modificazioni superficiali.

Un campo aperto al futuro sono sicuramente le modificazioni biochimiche, le quali mirano ad un controllo dei meccanismi osteointegrativi attraverso proteine e fattori di crescita. E' evidente che in questo caso, essendo ancora parziale la comprensione degli avvenimenti caratterizzanti la risposta ossea, è più difficile garantire il successo di una sperimentazione, in quanto non si tratta soltanto di rendere la superficie maggiormente osteoconduttiva, ma di creare dei materiali biomimetici, con la capacità di integrarsi completamente nei tessuti.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] *Trattato di anatomia umana (volume II)*, Edi-Ermes, 2008
- [2] Fallschussel G.K.H., *Implantologia odontoiatrica: teoria e pratica*, Edinava, 1989
- [3] Bedini R., Ioppolo P., Filippini P., Nastasi V., Caiazza S., Bianco A., Ortolani E., Barra P. *Studi in vitro e in vivo della biointegrazione di impianti dentali*. Istituto Superiore di Sanità, 2004
- [4] *Trattato di anatomia umana (volume I)*, Edi-Ermes, 2008
- [5] Di Bello C., *Biomateriali: introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*, Patron Editore, 2009
- [6] Beumer J., Lewis S.G., *Il sistema implantologico Brånemark: procedure cliniche e laboratorio*, Edinava, 1990
- [7] Ramaglia L., Capece G., Di Spigna G., Esposito D., Postiglione L. *In vitro expression of osteoblastic phenotype on titanium surfaces*. *Minerva Stomatologica*, 2010; 59:259-270
- [8] Albrektsson T., Johansson C. *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. *European Spine Journal*, 2001; 10: S96-S101
- [9] Letic-Gavrilovic A., Scandurra R., Abe K. *Genetic potential of interfacial guided osteogenesis in implant devices*. *Dental Materials Journal*, 2000; 19(2): 99-132
- [10] Scarano A., Iezzi G., Petrone G., Quaranta A., Piattelli A. *Valutazione della densità ossea perimplantare: uno studio sperimentale su coniglio*. *Il Dentista Moderno*, 2003; 5:95-107
- [11] Carinci F., Pezzetti F., Volinia S., Francioso F., Arcelli D., Marchesini I., Caramelli E., Piattelli A., *Analysis of MG63 osteoblastic-cell response to a new nanoporous implant surface by means of a microarray technology*. *Clinical Oral Implants Research*, 2004; 15: 180-186
- [12] Perrotti V., Scarano A., Iezzi G., Piattelli A. *Risposta ossea ad impianti a superficie nanoporosa anodizzata*. *Il Circolo, Rivista Periodica di Odontostomatologia*, 2004; 1: 13-20
- [13] Passeri G., Cacchioli A., Ravanetti F., Galli C., Elezi E., Macaluso G.M. *Adhesion pattern and growth of primary human osteoblastic cells on five commercially available titanium surfaces*. *Clinical Oral Implants Research*, 2010; 21: 756-765

- [14] Morra M., Cassinelli C., Crespi R., Covani U. *Valutazione in vitro di una nuova superficie implantare con morfologia nano strutturata*. Il Circolo, Rivista Periodica di Odontostomatologia, 2004; 1: 27-34
- [15] Pappalardo S., Baglio O.A., Carlino P., Grassi F.R. *Indagine al microscopio elettronico a scansione di diverse superfici implantari: studio comparativo*. European Journal of Implant Prosthodontics, 2005; 1(1):25-34
- [16] Le Guéhennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y. *Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*. Dental Materials, 2007; 23: 844-854
- [17] Conserva E., Tealdo T., Acquaviva A., Bevilacqua E., Volpara G., Pera P. *Analisi morfologica e valutazione della proliferazione cellulare in relazione a differenti trattamenti di superficie implantare: studio in vitro*. Implantologia, 2005; 4:303-317
- [18] Wennerberg A., Albrektsson T. *Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review*. Clinical Oral Implants Research, 2009; 20(4): 172-184
- [19] Dohan Ehrenfest D.M., Coelho P.G., Kang B.S., Sul Y.T., Albrektsson T. *Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography*. Trends in Biotechnology, 2010; 28(4): 198-206
- [20] Jarmar T., Palmquist A., Branemark R., Hermansson L., Engqvist H., Thomsen P. *Characterization of the surface properties of commercially available dental implants using scanning electron microscopy, focused ion beam, and high-resolution transmission electron microscopy*. Clinical Implant Dentistry and Related Research, 2008; 10(1)
- [21] CM Stanford. *Surface modifications of dental implants*. Australian Dental Journal, 2008; 53(1): S26-S33
- [22] Bagno A., Di Bello C. *Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2004; 15: 935-949
- [23] F.M. He, G.L. Yang, Y.N. Li, X. X. Wang, S.F. Zhao. *Early bone response to sandblasted, dual acid-etched and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCl treated titanium implants: an experimental study in the rabbit*. Int. J. Oral Maxillofac. Surg., 2009; 38: 677-681
- [24] Elias C. N., Oshida Y., Cavalcanti Lima J. H., Muller C. A. *Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials I, 2008; 234-242

- [25] Tadashi Martines R., Sendyk W. R., Gromatzky A., Ramos Cury P. *Sandblasted/acid-etched vs smooth-surface implants: implant mobility and clinical reaction to experimentally induced peri-implantitis in beagle dogs*. Journal of Oral Implantology, 2008; 34 (4)
- [26] Mueller C.K., Thorwarth M., Schmidt M., Schlegel K.A., Schultze-Mosgau S. *Comparative analysis of osseointegration of titanium implants with acid-etched surfaces and different biomolecular coatings*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011
- [27] Postiglione L., Di Domenico G., Ramaglia L., Di Lauro A.E., Di Meglio F., Montagnani S. *Different titanium surfaces modulate the bone phenotype of SaOS-2 osteoblast-like cells*. European Journal of Histochemistry, 2004; 49(3): 213-222
- [28] Quaranta A., Maida C., Scrascia A., Campus G., Quaranta M. *Er:Yag Laser application on titanium implant surfaces contaminated by Porphyromonas gingivalis: an histomorphometric evaluation*. Minerva Stomatologica, 2009; 58: 317-330
- [29] Jason Riley D., Bavastrello V., Covani U., Barone A., Nicolini C. *An in vitro study of the sterilization of titanium dental implants using low intensity UV-radiation*. Dental Materials, 2005; 21: 756-760
- [30] [http://www.ondanet.it/klike/01\\_Introduzione.pdf](http://www.ondanet.it/klike/01_Introduzione.pdf)