

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

EFFETTI DEI TRATTAMENTI SUPERFICIALI DEI MATERIALI PER IMPIANTI DENTALI SULLA MATRICE EXTRACELLULARE: UNO STUDIO INTEGRATO MEDIANTE ANALISI MORFOLOGICHE, MOLECOLARI E BIOCHIMICHE

EFFECTS OF SURFACE TREATMENTS OF DENTAL IMPLANT MATERIALS ON THE EXTRACELLULAR MATRIX: AN INTEGRATED STUDY USING MORPHOLOGICAL, MOLECULAR, AND BIOCHEMICAL ANALYSES

Tesi di Laurea di:

Alice Narcisi

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa

Eleonora Salvolini

Anno Accademico 2025 – 2026

INDICE

1. INTRODUZIONE 3

2. PARTE GENERALE 6

2.1. Tessuto osseo 6

2.2. Processo di ossificazione 12

2.2.1. Ossificazione diretta 12

2.2.2. Ossificazione indiretta 13

2.3. Meccanismo di mineralizzazione 14

2.4. Marcatori del differenziamento osteogenico e della matrice extracellulare . 15

2.4.1 Fosfatasi alcalina (ALP) 16

2.4.2. Collagene di tipo I (COL1A1) 17

2.4.3. SPARC (osteonectina) 18

2.4.4. Proteina della matrice dentinale 1 (DMP1) 19

2.5. Impianti sottoperiostei 19

3. MATERIALI E METODI 23

3.1. Colture cellulari 23

3.2. Modello sperimentale 23

3.3.2. Spettroscopia a Dispersione di Energia (EDS) 26

3.4. Determinazione della concentrazione proteica totale mediante saggio di Bradford 28

3.5. Western Blot 29

3.6. Microscopia a fluorescenza 29

3.7. Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP) 30

3.8. Analisi statistica 31

4. RISULTATI 32

4.1. Microscopia elettronica a scansione (SEM) e spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS) 32

4.2. Valutazione dei marcatori di differenziazione osteogenica e di formazione della matrice extracellulare (ECM) 34

4.3. Analisi mediante immunofluorescenza e microscopia confocale per la localizzazione subcellulare di DMP1 36

4.4. Attività della fosfatasi alcalina (ALP) 37

5. DISCUSSIONE 38

6. CONCLUSIONI 42

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA 43

1. INTRODUZIONE

Gli impianti dentali sono utilizzati per sostituire elementi dentari mancanti e ripristinare la funzione masticatoria e l'estetica. Il loro successo dipende dalla stabilità nel tempo e dalla capacità di integrarsi con i tessuti che li circondano. L'integrazione degli impianti con il tessuto osseo, in particolare, gioca un ruolo centrale. L'impiego di impianti osteointegrati rappresenta una soluzione consolidata e ampiamente adottata per la riabilitazione orale, ma il risultato clinico a lungo termine dipende in larga misura dalla qualità e dalla quantità dell'osso di supporto, nonché dalla stabilità dell'interfaccia osso-impianto (Javed et al., 2013).

Non tutti i pazienti possono però ricevere un impianto endosseo convenzionale; nello specifico, nei soggetti che presentano una grave atrofia ossea, l'utilizzo di tali impianti comporterebbe il ricorso a interventi chirurgici estesi e a procedure rigenerative complesse, che richiedono tempi prolungati e sono associate a risultati variabili. In questi casi gli impianti sottoperiostei sono nuovamente emersi come un'opzione terapeutica alternativa. Si tratta di dispositivi personalizzati che poggiano sulla superficie esterna della mandibola e del mascellare superiore, al di sotto del periostio, anziché essere inseriti in profondità nell'osso. Il rinnovato interesse verso questi manufatti si deve, in particolare, all'evoluzione delle tecniche di diagnostica per immagini e delle tecnologie di produzione additiva, nonché all'impiego di avanzati strumenti di progettazione digitale. Grazie all'acquisizione di immagini mediante tomografia computerizzata cone-beam (CBCT) e alla progettazione degli impianti mediante un software dedicato, è possibile infatti valutare preventivamente in modo preciso i siti di ancoraggio e la distribuzione dei carichi biomeccanici, permettendo la realizzazione di telai che si adattano perfettamente all'anatomia del paziente e possono essere posizionati in un'unica seduta chirurgica (Łoginoff et al.,2024).

Il titanio e le sue leghe sono ampiamente impiegati in implantologia. I moderni impianti sottoperiostei, nello specifico, sono generalmente realizzati in Ti6Al4V mediante laser melting (fusione laser), tecnica avanzata di stampa 3D che fonde strati di polvere metallica con un raggio laser per produrre oggetti complessi e resistenti. L'impiego di tale lega garantisce a questi dispositivi la biocompatibilità e conferisce loro eccellenti proprietà meccaniche e un'elevata resistenza alla corrosione, soprattutto in condizioni di

pH acido e aumentato stress ossidativo, tipiche dell'ambiente infiammatorio peri-implantare (Bordbar-Khiabani e Gasik, 2023).

La stabilità a lungo termine degli impianti sottoperiostei dipende principalmente da una rapida ed efficace integrazione a livello della superficie ossea. Di conseguenza, assumono un'importanza fondamentale le caratteristiche superficiali di tali manufatti, in grado di modulare attivamente il comportamento delle cellule deputate alla formazione di nuovo tessuto osseo. Per tale motivo, negli ultimi anni è stata dedicata grande attenzione alle modificazioni superficiali finalizzate a migliorare non solo l'adesione e la proliferazione delle cellule sui biomateriali a base di titanio, ma anche la loro differenziazione osteogenica. Tali approcci comprendono modificazioni topografiche su scala micro- e nanometrica, trattamenti chimici e rivestimenti bioattivi. Tra di essi rientrano la mordenzatura acida, la sabbiatura, l'anodizzazione e l'elettroerosione (Li et al., 2023).

Gli studi aventi come oggetto le superfici implantari trattate hanno preso in esame principalmente le risposte cellulari precoci, mentre la loro capacità di supportare le fasi più avanzate dell'osteogenesi non è stata ancora del tutto chiarita (Zhang e Chen, 2019). In particolare, i processi di deposizione, organizzazione e mineralizzazione della matrice extracellulare (ECM), fondamentali per l'instaurarsi di una stabile interfaccia osso-impianto e garantire la guarigione del tessuto, meritano di essere ulteriormente approfonditi. La matrice extracellulare del tessuto osseo è costituita da una componente organica, che comprende collagene di tipo I e proteine non collageniche, e da una componente inorganica, rappresentata principalmente da fosfato di calcio sotto forma di cristalli di idrossiapatite. La stretta interazione tra le due componenti è alla base della resistenza e delle peculiari proprietà meccaniche del tessuto osseo. Tuttavia, la matrice extracellulare svolge un ruolo che va oltre il semplice supporto strutturale, grazie alla capacità di legare diverse molecole coinvolte nell'adesione e nella segnalazione cellulare e di interagire in modo dinamico sia con gli osteoblasti che con gli osteoclasti, intervenendo nei processi di migrazione, proliferazione e differenziamento che permettono la rigenerazione del tessuto.

Tra le proteine della matrice maggiormente implicate nella mineralizzazione del tessuto osseo si distinguono il collagene di tipo I, che costituisce l'impalcatura sulla quale si deposita la componente minerale, e la fosfatasi alcalina, che favorisce la mineralizzazione attraverso l'idrolisi del pirofosfato, un potente inibitore di tale processo,

e contribuisce inoltre alla regolazione dello stato di fosforilazione dell'osteopontina (OPN), proteina coinvolta nei processi di rimodellamento osseo. Oltre a queste, numerose altre proteine della matrice ossea partecipano alla regolazione del processo di mineralizzazione, come l'osteonectina (chiamata anche SPARC -Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), che presenta una forte affinità per il collagene di tipo I e l'idrossiapatite, e la proteina della matrice dentinale 1 (DMP1), che contribuisce alla stabilizzazione dei precursori minerali non organizzati e ne favorisce il trasferimento verso le fibrille di collagene. La DMP1 forma infatti dei complessi con la componente minerale facilitando le interazioni elettrostatiche tra quest'ultima e il collagene durante la mineralizzazione. (Alcorta-Sevillano et al., 2020; Sekaran et al., 2021; Golub e Boesze-Battaglia, 2007).

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quindi quello di valutare gli effetti di diversi trattamenti superficiali, cui sono stati sottoposti dei dischi in Ti6Al4V, sulla formazione e la maturazione della matrice extracellulare da parte di linee cellulari simil-osteoblastiche (MG-63, SaOS-2). Nello specifico, sono state analizzate la morfologia delle cellule che hanno colonizzato i dischi e la composizione chimica dei depositi extracellulari osservabili al microscopio elettronico a scansione (SEM). Sono state inoltre valutate l'espressione e l'organizzazione di marcatori chiave associati alla matrice extracellulare e coinvolti nei processi osteogenici quali COL1A1, SPARC e DMP1, nonché l'attività della fosfatasi alcalina.

.

2. PARTE GENERALE

2.1. Tessuto osseo

Il tessuto osseo è una varietà specializzata di tessuto connettivo, contraddistinto dalla sua matrice mineralizzata attraverso la sedimentazione di cristalli d'idrossiapatite [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$], grazie ai quali il tessuto acquista rigidità e resistenza.

Le funzioni delle ossa non sono limitate al sostegno, al movimento ed alla protezione degli organi interni: di fatto, ospita il midollo osseo con le sue funzioni ematopoietiche; rappresenta la principale riserva di calcio e fosfato dell'organismo, la cui omeostasi è controllata da paratormone, calcitonina e vitamina D; ha proprietà endocrine, perché produce l'osteocalcina che viene riversata in circolo e, come un ormone, stimola la secrezione di insulina da parte delle cellule beta del pancreas.

Le superfici ossee sono ricoperte da due membrane connettivali che assicurano la nutrizione, l'accrescimento e la rigenerazione dell'osso. Nello specifico, il periostio riveste la superficie esterna ed è formato da uno strato fibroso superficiale e da uno strato profondo ricco di capillari e di cellule osteoprogenitrici. I vasi sanguigni presenti nel periostio penetrano nella parte più densa e compatta dell'osso passando attraverso canali perforanti e garantiscono così l'apporto di ossigeno e sostanze nutritive anche agli strati più profondi. L'endostio, invece, riveste le cavità midollari, le trabecole dell'osso spugnoso e le pareti dei canali di Havers; è costituito da una sottile componente di tessuto connettivo e da uno strato discontinuo di cellule osteoprogenitrici appiattite. La sua struttura consente l'esposizione dell'ECM, favorendo l'accesso delle cellule osteoprogenitrici ai siti di mineralizzazione e la loro successiva differenziazione in osteoblasti.

Le cellule del tessuto osseo derivano da due linee differenti: le cellule osteoprogenitrici, gli osteoblasti e gli osteociti hanno derivazione mesenchimale, mentre gli osteoclasti derivano da cellule progenitrici ematopoietiche del midollo osseo appartenenti alla linea monocito-macrofagica. Nell'osso adulto gli osteociti rappresentano la popolazione più abbondante, seguiti da osteoblasti e da osteoclasti: questa distribuzione riflette il destino delle cellule, la maggior parte delle quali una volta completata la deposizione della matrice, resta inclusa al suo interno. Le cellule osteoprogenitrici presentano una forma appiattita, un nucleo ovale e scarso citoplasma. Sono localizzate principalmente nel

periostio e nell'endostio, dove mantengono la capacità di proliferare e differenziarsi in osteoblasti. La loro attività proliferativa aumenta soprattutto durante l'accrescimento osseo e nei processi di riparazione e rimodellamento dell'osso. L'attivazione di queste cellule verso la linea osteoblastica è regolata da diverse molecole segnale, tra cui le Bone Morphogenetic Proteins (BMP) e le proteine Wnt (Wingless-related integration site). Queste molecole attivano specifiche vie di trasduzione del segnale intracellulare, che regolano l'espressione di fattori di trascrizione come Runx2 (Runt-related transcription factor 2), Dlx5 (Distal-less homeobox 5) e Osterix (Osx), fondamentali per il differenziamento delle cellule osteoprogenitrici in osteoblasti. Questi ultimi sono cellule metabolicamente molto attive, caratterizzate da un nucleo voluminoso, numerosi mitocondri, un reticolo endoplasmatico rugoso molto esteso e un apparato di Golgi particolarmente sviluppato. Tali caratteristiche riflettono la loro intensa attività di sintesi proteica. Gli osteoblasti infatti sintetizzano e secernono le componenti organiche della matrice ossea non ancora mineralizzata, detta osteoide. Tra queste rientrano il collagene di tipo I, le sialoproteine ossee, l'osteocalcina, i proteoglicani e altre glicoproteine. Essi inoltre regolano la deposizione della sostanza inorganica, attraverso la produzione e il rilascio della fosfatasi alcalina, che crea un ambiente biochimico adatto per la formazione e deposizione dei cristalli di idrossiapatite attraverso la scissione dei gruppi fosfato e l'inibizione del pirofosfato extracellulare. La polarizzazione del nucleo testimonia che le cellule secernono grande quantità di osteoide prevalentemente verso il fronte di mineralizzazione del tessuto, sebbene la secrezione possa avvenire anche nelle altre direzioni. Quando un osteoblasto rimane completamente inglobato nella matrice ossea che ha contribuito a produrre, si differenzia in osteocita, una cellula specializzata nel mantenimento della matrice e nella percezione degli stimoli meccanici. Oltre all'attività di deposizione di nuovo tessuto osseo, gli osteoblasti giocano un ruolo chiave nella regolazione del rimodellamento osseo, attivando la proliferazione e il differenziamento dei precursori degli osteoclasti tramite la produzione di RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand) e M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) e inibendo il processo attraverso la produzione di osteoprotegerina (OPG), recettore-esca che entra in competizione con RANK per il legame con RANKL.

Gli osteociti hanno un corpo cellulare ovale, accolto in una cavità della matrice denominata lacuna ossea; da esso si dipartono dei sottili prolungamenti citoplasmatici che

decorrono all'interno dei canalicoli ossei, attraversando la matrice mineralizzata. Le lacune e i canalicoli sono ben evidenziabili con la fucsina basica, che rende visibile il complesso sistema di comunicazione che permette lo scambio di nutrienti e la sopravvivenza degli osteociti. I prolungamenti citoplasmatici degli osteociti entrano in contatto tra loro e con altre cellule ossee, in particolare gli osteoblasti, attraverso giunzioni comunicanti (gap junction), che consentono il rapido passaggio di ioni calcio e contribuiscono in questo modo alla trasmissione dei segnali cellulari e alla coordinazione dei processi di rimodellamento osseo. Gli osteociti agiscono da meccanocettori, monitorando continuamente l'ambiente circostante. In base alla morfologia e allo stato funzionale possiamo distinguere tre tipologie di osteocita:

- Quiescente, che occupa tutta la lacuna ossea e presenta una ridotta attività metabolica;
- Formativo, che mantiene una certa attività di sintesi e deposizione di nuova matrice ossea e presenta un aspetto simile a quello dell'osteoblasto;
- Riassorbente, che presenta numerosi lisosomi contenenti enzimi che riassorbono la matrice ossea circostante (osteolisi osteocitaria).

Dunque, l'osteocita è in grado di controllare localmente la deposizione di osso e il suo rimodellamento in risposta a una variazione del metabolismo minerale o ad una modificazione del carico meccanico.

Gli osteoclasti sono le cellule responsabili del riassorbimento osseo. Derivano dalla linea monocito-macrofagica e sono dei sincizi di grandi dimensioni che nella forma inattiva non possiedono una polarizzazione marcata. La loro capacità di movimento e di adesione alla superficie ossea dipende dal citoscheletro, particolarmente ricco di filamenti di actina. Indotto da segnali sistemici o locali, l'osteoclasto migra nel sito di riassorbimento e si polarizza, riorganizzando la propria membrana plasmatica e il citoscheletro in modo da orientare il polo attivo verso il fronte di erosione. Successivamente aderisce alla superficie ossea tramite i podosomi, strutture ricche di microfilamenti di actina associati ad altre proteine come la vinculina e le integrine; in questo modo dà origine ad una zona sigillante, che delimita un compartimento nel quale avverrà la degradazione della matrice tramite l'azione combinata di molecole acidificanti ed enzimi lisosomiali. La regione della membrana plasmatica direttamente coinvolta nel processo di riassorbimento osseo prende il nome di orletto increspato ed è caratterizzata da numerosi ripiegamenti in cui si

concentrano vescicole e lisosomi. Il processo si articola in due fasi:

- All'interno dell'osteoclasto l'anidrasi carbonica catalizza la formazione di acido carbonico che poi si dissocia dando origine a protoni e ioni bicarbonato; gli ioni H^+ vengono quindi pompati nella lacuna di riassorbimento, determinando un abbassamento del pH che favorisce la dissoluzione della componente inorganica della matrice;
- la degradazione della componente organica avviene invece ad opera degli enzimi lisosomiali, che comprendono la catepsina K, la fosfatasi acida tartrato-resistente e le metalloproteasi.

L'attività delle cellule ossee è orchestrata da segnali endocrini e da molecole coinvolte nella comunicazione locale. Il paratormone, prodotto dalle ghiandole paratiroidi, è il principale ormone deputato ad aumentare i livelli di calcio nel sangue: a livello scheletrico esso stimola infatti il rilascio di calcio dalla matrice, promuovendo negli osteoblasti una maggiore produzione di RANKL, con conseguente aumento dell'attività osteoclastica. Al contrario la calcitonina, prodotta della tiroide, diminuisce la calcemia inibendo il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti. Anche la forma attiva della vitamina D (1,25-diidrossicolecalciferolo, o calcitriolo), prodotta a livello renale, svolge un ruolo importante nell'omeostasi del calcio, stimolando la mineralizzazione della matrice prodotta dagli osteoblasti. L'ormone della crescita agisce invece sul fegato inducendo la produzione di IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) e IGF-2, che promuovono la crescita scheletrica. Gli osteoblasti e gli osteociti partecipano alla regolazione del riassorbimento attraverso la liberazione di fattori attivanti gli osteoclasti (OAF), che stimolano il riassorbimento osseo; come già detto in precedenza, gli osteoblasti producono inoltre RANKL, che promuove il differenziamento e l'attivazione degli osteoclasti, e OPG, che riduce al contrario il riassorbimento osseo.

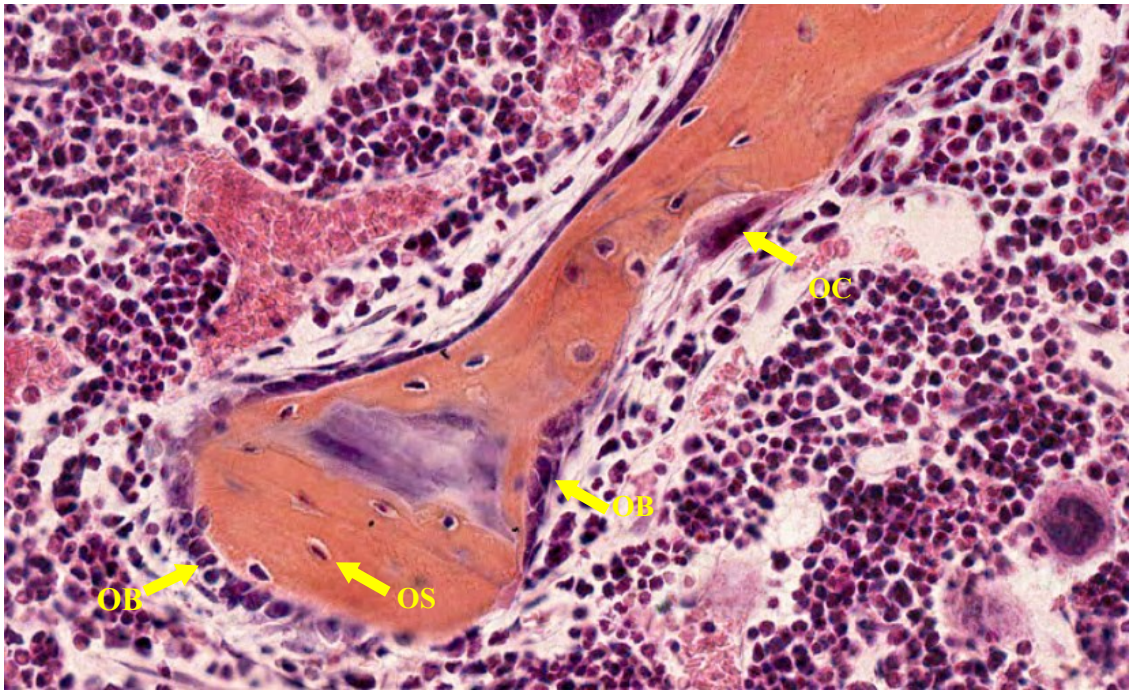


Figura 1. *Preparazione decalcificata di osso spugnoso, ingrandimento 400x. In questa spicola è possibile osservare: osteoblasti (OB), osteociti (OS) imprigionati nella matrice mineralizzata e un osteoclasto (OC)* *(https://digitalhistology.org/)*.

Per quanto riguarda la matrice extracellulare ossea, essa è costituita da una componente organica e da una componente inorganica. La prima è formata da una componente fibrosa e da una sostanza fondamentale amorfa. La componente fibrosa è rappresentata prevalentemente da collagene di tipo I, che costituisce circa il 90% delle proteine ossee e si organizza in fibrille dopo la secrezione da parte degli osteoblasti. Le fibrille sono immerse nella sostanza fondamentale, costituita da una componente non collagenica che comprende proteoglicani, glicoproteine come l'osteonectina, la fosfatasi alcalina e le sialoproteine, e proteine contenenti acido γ-carbossiglutammico (Gla), tra cui la più importante è l'osteocalcina, che è prodotta esclusivamente dagli osteoblasti e rappresenta la seconda proteina più abbondante della matrice ossea: il suo ruolo consiste nell'inibire la mineralizzazione legando il calcio per renderlo temporaneamente indisponibile. La componente inorganica della matrice comprende prevalentemente calcio e fosforo, con quantità minori di altri ioni, tra cui magnesio, sodio e potassio. Il fosfato di calcio si presenta principalmente sotto forma di cristalli di idrossiapatite, che appaiono aghiformi o fusiformi, e si dispongono in stretta associazione con le fibrille di collagene immerse

nella sostanza amorfa. Sulla superficie dei cristalli c'è un guscio di idratazione, composto da acqua e ioni, che facilitano il continuo scambio di elementi tra i cristalli stessi e i liquidi circostanti.

In base all'organizzazione della matrice extracellulare è possibile distinguere un tessuto osseo non lamellare, nel quale le fibre di collagene sono raccolte in grossi fasci intrecciati, orientati in modo irregolare, e un tessuto osseo lamellare, che è organizzato in lamelle costituire da fibre di collagene disposte secondo un orientamento ordinato. Tra le lamelle, o al loro interno, si trovano le lacune ossee che ospitano gli osteociti. In base alla disposizione delle lamelle il tessuto lamellare può essere a sua volta distinto in lamellare semplice e lamellare osteonico. Nell'osso compatto l'unità strutturale e funzionale è rappresentata dall'osteone, caratterizzato da una disposizione concentrica delle lamelle attorno ad un canale, chiamato canale di Havers, al cui interno troviamo vasi sanguigni e linfatici e fibre nervose; nell'osso spugnoso, invece, le lamelle sono organizzate in trabecole, che formano una rete tridimensionale che delimita spazi occupati dal midollo osseo e da vasi sanguigni; all'interno delle trabecole le lamelle sono disposte parallelamente o secondo orientamenti differenti in funzione delle sollecitazioni meccaniche (Figura 2) (Angelucci et al., 2025) .

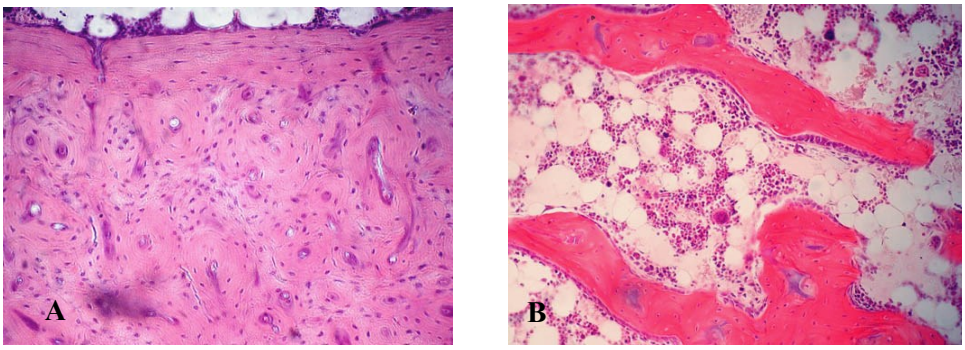


Figura 2. *(A) Tessuto osseo lamellare compatto. Sezione trasversale di osso lungo a livello diafisario. (B) Tessuto osseo lamellare spugnoso. All'interno degli spazi delimitati dalle trabecole è presente il midollo osseo. Colorazione: emallume-eosina.*
(https://www.atlanteistologia.unito.it/)

2.2. Processo di ossificazione

Con il termine ossificazione si indica l'insieme dei processi attraverso i quali il tessuto osseo si forma a partire da un tessuto preesistente. Nell'ossificazione diretta o intramembranosa, l'osso si forma direttamente all'interno di un tessuto connettivale di tipo mesenchimale; mentre nell'ossificazione indiretta o endocondrale, l'osso si forma sostituendo il tessuto cartilagineo che funge da modello provvisorio dei futuri segmenti ossei (Angelucci et al., 2025).

2.2.1. Ossificazione diretta

Questo processo ha inizio in un tessuto mesenchimale ancora indifferenziato, dove alcune cellule stellate si accumulano nel punto in cui dovrà formarsi l'osso: questo punto costituisce il centro di ossificazione primario. Nelle zone periferiche le cellule mesenchimali si addensano andando a formare il periostio, mentre all'interno si svolge il processo osteogenetico. Alcune cellule mesenchimali del centro primario ritirano i prolungamenti e si trasformano in cellule osteoprogenitrici, dalle quali originano gli osteoblasti che si allineano e iniziano a produrre l'osteoide. La matrice organica, ricca di fibrille collagene di tipo I, andrà incontro a mineralizzazione per trasformarsi in osso fibroso. Durante la deposizione alcuni osteoblasti restano intrappolati nella matrice e diventano osteociti. Nel frattempo, nuove cellule mesenchimali giungono nella zona di ossificazione e si trasformano in osteoblasti permettendo l'accrescimento dell'osso. Le ossa frontali e parietali, così come alcune porzioni dell'osso occipitale, temporale e mascellare si formano per ossificazione intramembranosa. Tale processo contribuisce anche all'ispessimento delle ossa lunghe e alla crescita di quelle brevi.

Un caso particolare è rappresentato dall'ossificazione mantellare del corpo della mandibola, in cui la cartilagine di Meckel non viene sostituita direttamente ma funge da guida per la produzione di osso, che si forma per ossificazione intramembranosa all'esterno del pericondrio. Successivamente la cartilagine va incontro a degenerazione e riassorbimento e nello spazio che si crea continua a crescere il tessuto osseo (Angelucci et al., 2025).

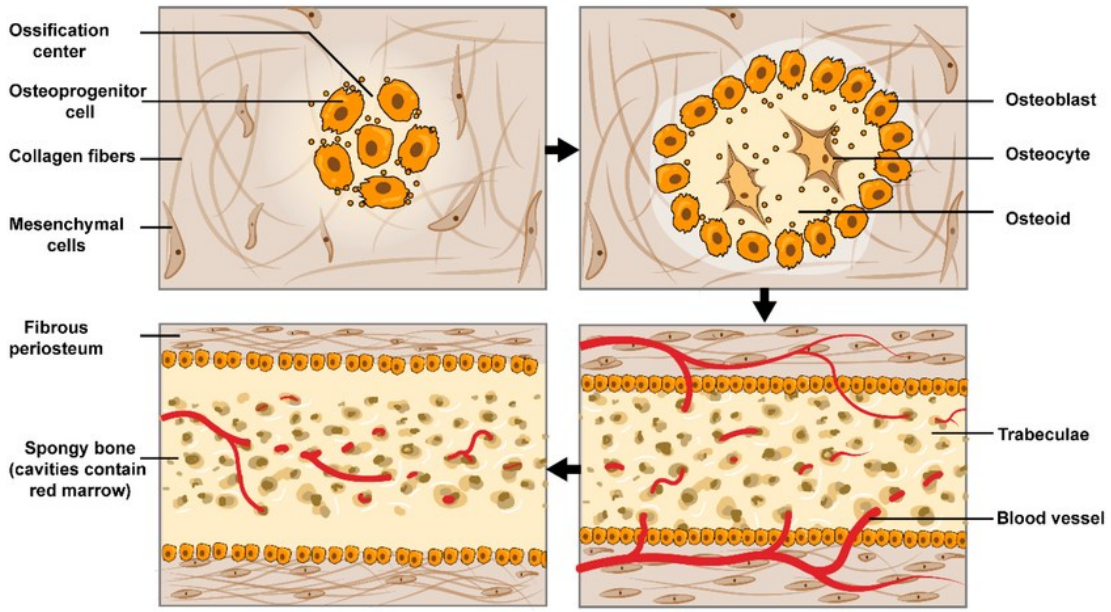


Figura 3. *Processo di ossificazione intramembranosa (Gao et al., 2023).*

2.2.2. Ossificazione indiretta

L'ossificazione indiretta è la modalità con cui si forma la maggior parte dello scheletro, in particolare le ossa lunghe. Il processo parte da un primo modello cartilagineo prodotto dai condroblasti e poi ingrandito per accrescimento interstiziale e per apposizione.

All'interno della diafisi compare il centro di ossificazione primario, dove i condrociti proliferano formando gruppi isogeni voluminosi, immersi in una scarsa matrice extracellulare. Successivamente i condrociti vanno incontro a ipertrofia; in questa fase essi esprimono collagene di tipo X, producono il VEGF (Vascular Endothelial Grownth Factor), che stimola l'angiogenesi, e rilasciano vescicole che contengono pirofosfatasi e fosfatasi alcalina, che favoriscono la calcificazione della matrice cartilaginea. Man mano che la mineralizzazione prosegue, la diffusione dei nutrienti si riduce, fino ad indurre l'apoptosi dei condrociti. Mentre il centro di ossificazione primario cresce, le cellule osteoprogenitrici che si trovano al di sotto del pericondrio della diafisi si differenziano in osteoblasti che formano il manicotto periostale per ossificazione diretta. Grazie al VEGF prodotto dai condrociti, dal periostio iniziano a penetrare dei vasi sanguigni che occupano le lacune lasciate libere dalle cellule cartilaginee morte. Insieme ai capillari, entrano nel centro di ossificazione primario anche cellule staminali emopoietiche, condroclasti e cellule osteoprogenitrici. Queste ultime si differenziano in osteoblasti, che iniziano a

deporre l'osteoide, mentre i condroclasti contribuiscono al riassorbimento della matrice cartilaginea. A livello della diafisi l'osso aumenta progressivamente di diametro, grazie all'azione combinata di due processi: accrescimento per apposizione a livello del periostio e erosione interna della cavità midollare ad opera degli osteoclasti. Alla nascita le epifisi sono ancora formate da tessuto cartilagineo e solo successivamente si svilupperanno al loro interno i centri di ossificazione secondaria, che formeranno tessuto osseo spugnoso con un processo simile a quello avvenuto nella diafisi.

Il primitivo abbozzo cartilagineo viene progressivamente sostituito da tessuto osseo ad eccezione del disco epifisario, che permette l'accrescimento longitudinale dell'osso fino all'età adulta, e la cartilagine articolare, che permane sulle superfici articolari delle epifisi (Angelucci et al., 2025).

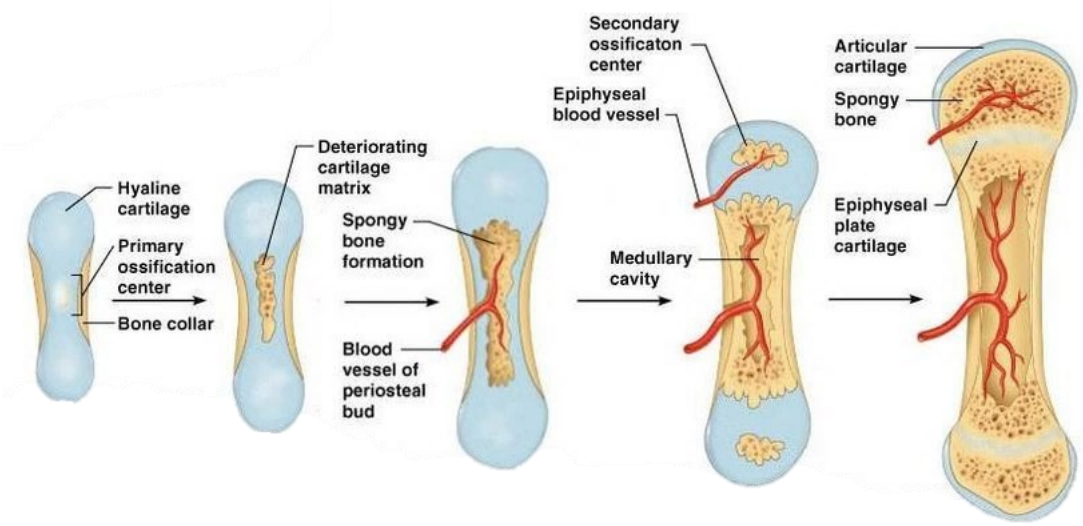


***Figura 4**. Schema illustrativo delle fasi che compongono il processo di ossificazione endocondrale (Dermience Michael, 2010).*

2.3. Meccanismo di mineralizzazione

Robert Robinson, nel 1923, ipotizzò che la deposizione dei sali di fosfato di calcio nelle zone calcificate fosse associata alla fosfatasi alcalina degli osteoblasti, che con la sua attività enzimatica avrebbe favorito l'aumento della disponibilità di fosfato inorganico fino al raggiungimento di condizioni favorevoli alla precipitazione dei sali di calcio. Successivamente, degli studi più recenti hanno dimostrato che la mineralizzazione è un

processo che si svolge in tre fasi coordinate nello spazio e nel tempo che inizia con la formazione di vescicole.

Le vescicole della matrice, o vescicole di Bonucci, sono strutture extracellulari rilasciate dagli osteoblasti e dai condrociti, coinvolte nella formazione di tessuti mineralizzati e identificate in diversi tessuti soggetti a calcificazione fisiologica. Il processo di mineralizzazione prosegue con l'accumulo al loro interno di ioni calcio e fosfato e con la formazione dei primi nuclei di fosfato di calcio, che successivamente maturano verso una fase minerale di tipo apatite. Le vescicole costituiscono un ambiente favorevole all'avvio della mineralizzazione, mentre gli osteoblasti contribuiscono alla formazione e alla regolazione della matrice extracellulare e alla disponibilità dei componenti necessari alla deposizione minerale.

La fase iniziale, infatti, avviene a livello delle vescicole, ricche di enzimi, tra cui la fosfatasi alcalina, e cristalli di sale di calcio che agiscono come nuclei di accrescimento, fungendo da innesco fondamentale per il processo di mineralizzazione.

Nella seconda fase, i cristalli di fosfato di calcio si accumulano dentro le vescicole, crescendo e maturando, fino a propagarsi nella matrice extracellulare circostante, in cui la concentrazione degli ioni e la composizione della matrice influenzano la loro crescita e organizzazione. I cristalli si associano alle le fibre di collagene e maturano progressivamente verso una fase minerale di tipo apatite. Nell'ultimo stadio del processo, le diverse zone di mineralizzazione si uniscono e i cristalli continuano accrescere e ad organizzarsi in relazione alla struttura periodica delle fibrille collageniche, determinando la progressiva mineralizzazione e maturazione della matrice ossea (Angelucci et al., 2025).

2.4. Marcatori del differenziamento osteogenico e della matrice extracellulare

Il differenziamento osteogenico è un processo complesso e finemente regolato, caratterizzato da una successione coordinata di eventi che comprendono la proliferazione e la maturazione delle cellule osteoblastiche, la deposizione della matrice extracellulare e la sua progressiva mineralizzazione (Ponzetti e Rucci, 2021). Durante questo processo, gli osteoblasti esprimono specifici enzimi, proteine strutturali e proteine non collageniche

che contribuiscono allo sviluppo della matrice ossea. Tra i marcatori conosciuti per valutare il differenziamento osteogenico e la maturazione della matrice ossea rientrano la fosfatasi alcalina (ALP) (Vimalraj, 2020), la catena α1 del collagene di tipo I (COL1A1) , e proteine della matrice extracellulare, tra cui SPARC (osteonectina) (Rosset e Bradshaw, 2016) e la DMP1 (Qin et al., 2007). Sebbene questi marcatori siano tutti associati al processo osteogenico, la loro espressione e funzione riflettono aspetti differenti della maturazione cellulare e della formazione della matrice. L'attività della ALP è associata alla maturazione osteoblastica e alla capacità di creare un microambiente favorevole alla mineralizzazione (Sekaran et al., 2021); COL1A1 riflette la sintesi e la deposizione della matrice organica (Dacic et al., 2001); SPARC è coinvolta nell'organizzazione e nel rimodellamento della matrice extracellulare (Rosset e Bradshaw, 2016); infine, DMP1 è maggiormente associata alla maturazione osteogenica e alla mineralizzazione della matrice (Feng et al., 2006). L'utilizzo di questi marcatori permette una caratterizzazione più completa delle modificazioni fenotipiche e funzionali associate al differenziamento delle cellule della linea osteogenica.

2.4.1 Fosfatasi alcalina (ALP)

La fosfatasi alcalina appartiene ad una famiglia di enzimi idrolitici in grado di catalizzare la rimozione di gruppi fosfato da diversi substrati, tra cui il pirofosfato inorganico (PPi) e il piridossal-5'-fosfato (PLP), mediante reazioni di de-fosforilazione. Nell'uomo sono presenti quattro forme principali: la forma intestinale, quella placentare, la forma germinale e la fosfatasi alcalina tissutale non specifica (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNAP). Quest'ultima è espressa in diversi tessuti, tra cui fegato, rene, tessuto osseo e tessuto dentale, rappresentando la principale isoforma coinvolta nei processi di mineralizzazione dello scheletro. Nel tessuto osseo, la TNAP è espressa principalmente dalle cellule della linea osteoblastica e svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'ambiente extracellulare durante la mineralizzazione (Narisawa et al., 2013; Liedtke et al., 2020).

Dal punto di vista strutturale la TNAP è un ectoenzima ancorato alla membrana plasmatica tramite il glicofosfatidilinositolo (GPI), una molecola lipidica che mantiene la proteina associata superficie esterna della cellula, e orientata verso lo spazio

extracellulare dove svolge le sue funzioni. Inoltre, è un metalloenzima omodimerico, costituito da due monomeri identici, ciascuno dei quali contiene due ioni Zn^{2+} e uno ione Mg^{2+} essenziali per l'attività catalitica (Sekaran et al., 2021).

L'espressione della TNAP è molto elevata sulla membrana plasmatica degli osteoblasti, degli odontoblasti e dei condrociti ipertrofici, che sono cellule deputate alla formazione dei tessuti mineralizzati.

La mineralizzazione è la produzione, all'interno di vescicole della matrice, che gemmano dalla membrana esterna degli osteoblasti e dei condrociti ipertrofici, di cristalli di idrossiapatite. Nelle vescicole extracellulari si accumulano calcio e fosfato che favoriscono la formazione dei primi cristalli di fosfato di calcio, che successivamente si sviluppano nella matrice extracellulare. La TNAP svolge un ruolo centrale nel controllo del rapporto tra fosfato inorganico (Pi) e pirofosfato inorganico (PPi), idrolizzando il PPi e generando Pi. Poiché il PPi rappresenta un potente inibitore della formazione e della crescita dei cristalli di apatite, la sua degradazione da parte della TNAP favorisce la formazione della fase minerale (Vimalraj, 2020). In questo processo, la TNAP agisce in sinergia con PHOSPHO1, che contribuisce alla disponibilità di Pi all'interno delle vescicole. L'importanza di questo sistema è evidenziata dal fatto che la perdita combinata di TNAP e PHOSPHO1 determina un grave difetto della mineralizzazione ossea (Liedtke et al., 2020; Sekaran et al., 2021). Il ruolo essenziale della TNAP nella mineralizzazione è ulteriormente dimostrato dalla sua rilevanza patologica: mutazioni del gene ALPL, che codifica per la TNAP, causano l'ipofosfatasia, caratterizzata da un difetto della mineralizzazione di ossa e denti. Al contrario, l'aumento dell'attività della TNAP può favorire la mineralizzazione scheletrica. Queste evidenze hanno inoltre portato allo sviluppo di forme ricombinanti di TNAP utilizzate nella terapia enzimatica sostitutiva dell'ipofosfatasia (Narisawa et al., 2013).

2.4.2. Collagene di tipo I

Il collagene di tipo I costituisce circa il 90% della matrice ossea organica. Il gene COL1A1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain) codifica la catena α1 del collagene di tipo I, che, associandosi alla catena α2, contribuisce alla formazione della caratteristica struttura a tripla elica del procollagene. Il collagene di tipo 1 è considerato un marcatore delle fasi

precoce e intermedia del differenziamento osteoblastico. In particolare, la sua sintesi è fondamentale per fornire l'impalcatura strutturale su cui avviene successivamente la mineralizzazione. La sua sintesi cellulare passa attraverso la produzione di procollagene, che viene successivamente trasformato in tropocollagene. Le molecole di tropocollagene si autoassemblano nella matrice extracellulare formando fibrille di collagene, che vengono successivamente stabilizzate mediante la formazione di legami crociati e organizzate in fibre mature (Selvaraj et al., 2024).

Nel tessuto osseo, questa rete fibrillare costituisce l'impalcatura organica sulla quale si deposita la componente minerale, costituita prevalentemente da cristalli di idrossiapatite. L'organizzazione della matrice collagenica contribuisce alle proprietà meccaniche dell'osso e fornisce una struttura di supporto per la deposizione e l'organizzazione della fase minerale. L'espressione di COL1A1 è comunemente utilizzata come indicatore della sintesi e della deposizione della matrice collagenica da parte delle cellule della linea osteoblastica durante il differenziamento osteogenico, sebbene debba essere interpretata insieme ad altri marcatori di differenziamento e maturazione osteoblastica (Lin, et al., 2020).

2.4.3. SPARC (osteonectina)

La proteina SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), nota anche come osteonectina, è una glicoproteina matricellulare non collagenica coinvolta nella fibrillogenesi del collagene, nella modulazione delle interazioni cellula-matrice e nella regolazione della segnalazione dei fattori di crescita (Rosset e Bradshaw, 2016).

L'espressione di SPARC aumenta durante il rimodellamento osseo, per questo livelli elevati sono correlati ad attività osteoblastica precoce e attivo turnover osseo. I livelli della proteina SPARC raggiungono un picco durante le fasi iniziali del differenziamento e diminuiscono progressivamente con la maturazione cellulare e con l'inizio dell'espressione dei marcatori degli osteoblasti maturi (Zhu et al., 2020).

Nei modelli animali privi di SPARC si osserva una ridotta densità minerale ossea, fibrille di collagene compromesse e una resistenza meccanica diminuita, elementi che sottolineano il ruolo della proteina nella mineralizzazione della matrice ossea (Cesur et al., 2026).

2.4.4. Proteina della matrice dentinale 1 (DMP1)

La proteina 1 della matrice dentinale (DMP1) è una fosfoproteina acida non collagenica che appartiene alla famiglia SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) e svolge un ruolo fondamentale nel differenziamento tardivo degli osteoblasti, nella maturazione degli osteociti e nella regolazione della mineralizzazione. DMP1 è localizzata principalmente nel compartimento nucleare degli osteoblasti indifferenziati, dove agisce come fattore di trascrizione per l'attivazione di geni specifici degli osteoblasti, come l'osteocalcina. Durante la fase di maturazione cellulare, il Ca^{2+} si trasferisce dal citoplasma al nucleo innescando la fosforilazione di DMP1, che viene quindi esportata nella matrice extracellulare, dove partecipa all'avvio della nucleazione di idrossiapatite. La DMP1 è coinvolta in modo cruciale nell'omeostasi del fosfato e nella formazione dei cristalli di idrossiapatite; la sua espressione è strettamente correlata alla transizione da osteoblasti a osteociti inclusi nella matrice mineralizzata. L'ablazione genica della DMP1 determina gravi difetti nella mineralizzazione dell'osso e della dentina, sottolineando il ruolo essenziale di tale proteina nella biologia scheletrica. (Narayanan et al., 2003; Kalajzic et al., 2004; Ye et al., 2004).

2.5. Impianti sottoperiostei

Gli impianti sottoperiostei rappresentano un'alternativa riabilitativa efficace nei pazienti affetti da gravi atrofie mascellari. Infatti, sebbene gli impianti endossei offrano risultati clinici prevedibili, il loro inserimento richiede una quantità e una qualità di tessuto osseo adeguate. Nei casi di atrofia severa, il ripristino del volume osseo può richiedere interventi di chirurgia ricostruttiva che comportano un rischio elevato di andare incontro a complicanze e lunghi tempi di trattamento, oltre a un maggior impegno di risorse professionali. Gli impianti sottoperiostei consentono di superare queste criticità, perché vengono posizionati al di sotto del periostio, appoggiati sull'osso alveolare residuo, in modo da riuscire a distribuire i carichi masticatori su una superficie molto più ampia. Questa opzione evita il prelievo di osso autologo da siti donatori e l'esecuzione di procedure ricostruttive particolarmente invasive, rappresentando una valida soluzione riabilitativa anche per pazienti con difetti ossei dovuti a patologie tumorali o traumi.

Gli impianti sottoperiostei furono sviluppati in Svezia già negli anni '40 del secolo scorso e inizialmente venivano realizzati in leghe di cromo-cobalto o in resina autopolimerizzante. Questi impianti erano però associati a un'elevata incidenza di complicanze, tra cui la perdita precoce dell'impianto e l'insorgenza di infezioni dovute alla scarsa adattabilità del dispositivo. Inoltre erano necessari due interventi chirurgici: il primo per replicare l'anatomia dell'osso mediante la realizzazione di un calco ottenuto direttamente sulla superficie ossea del paziente, il secondo per il posizionamento dell'impianto. Per queste ragioni, con l'avvento e la diffusione degli impianti endossei osteointegrati, quelli sottoperiostei furono in gran parte abbandonati (Sánchez-Labrador et al., 2025).

Di recente è stato però rivalutato il loro uso, grazie alle moderne conoscenze dei materiali e dei fenomeni biologici coinvolti. È stato infatti scoperto che le leghe di cobalto-cromo, rilasciano ioni tossici che interferiscono sul differenziamento degli osteoblasti e degli osteoclasti, con conseguente riduzione della biocompatibilità e della stabilità dell'impianto (Chen et al., 2021). Per questo motivo, il materiale di elezione per i moderni impianti dentali sottoperiostei è la lega metallica Ti6Al4V (titanio, alluminio, vanadio), che offre un'elevata biocompatibilità, un basso peso e un'ottima resistenza alla corrosione e all'usura (Lorusso et al., 2023).

L'interazione tra il substrato e il tessuto osseo è favorita da un sottile strato di ossido di titanio che si forma spontaneamente sulla superficie della lega. Le moderne nanobiotecnologie modificano questo strato nativo tramite trattamenti elettrochimici e chimici, in modo da incorporare elementi come calcio, fosforo e zolfo direttamente nella struttura dell'ossido, formando così un rivestimento potenziato che accelera l'osteointegrazione cellulare e contrasta le infezioni (Silva et al., 2022).

Un ruolo centrale nella rinnovata diffusione di questi impianti è svolto dalle modifiche superficiali, che stimolano la neoformazione ossea e quindi l'osteointegrazione. Per la stabilità a lungo termine del dispositivo è necessario un elevato grado di contatto osso-impianto e la rugosità superficiale è uno dei principali fattori che lo permettono; infatti, le superfici ruvide migliorano l'adesione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule osteogeniche, anche attraverso il rilascio di molecole come il transforming growth factor-beta (TGF-β) e la prostaglandina E2 (Lorusso et al., 2023).

Studi *in vitro* condotti con cellule osteoblasto-simili umane della linea MG-63, dimostrano che le caratteristiche topografiche della superficie implantare influenzano il comportamento cellulare. In particolare, le superfici ruvide, ottenute tramite sabbiatura e mordenzatura acida, modificano il comportamento delle cellule (Im et al., 2023).

Su questi presupposti si basa il diverso trattamento a cui vengono sottoposte le superfici durante la fabbricazione degli impianti sottoperiostei moderni: la superficie destinata al contatto con i tessuti molli viene levigata, mentre quella che poggia direttamente sull'osso viene lasciata ruvida (Ângelo et al., 2020). Aumentando l'irregolarità della superficie verrebbe infatti favorita la neoformazione di tessuto osseo e allo stesso tempo viene ostacolata l'adesione dei fibroblasti, perché la crescita di tessuto molle renderebbe l'impianto più instabile e meno duraturo (Lorusso et al., 2023). Quando un impianto dentale viene inserito, il contatto con i fluidi biologici determina l'adsorbimento di proteine sulla sua superficie, influenzando l'interazione tra il materiale e i tessuti circostanti (Barberi e Spriano, 2021). Per far sì che l'impianto si integri con l'osso, esso deve rimanere immobile durante la guarigione, perché anche dei micromovimenti possono impedire la corretta f ormazione di nuovo tessuto osseo e causare la produzione di tessuto cicatriziale fibroso, capace di incapsulare l'impianto e impedirne la corretta osteointegrazione (Kohli et al., 2021).

Per prevenire questo rischio e garantire un successo clinico, l'impianto viene saldamente fissato con viti apposite (Ângelo et al., 2020).

Oggi la progettazione degli impianti sottoperiostei si basa su un flusso di lavoro interamente, che consente di evitare il primo intervento chirurgico finalizzato alla realizzazione di un calco diretto della superficie ossea. A partire dai dati della CBCT, gli ingegneri e il chirurgo progettano un impianto personalizzato che si adatta alla morfologia dell'osso residuo, grazie all'ausilio di software di progettazione tridimensionale.

La fabbricazione di tali impianti prevede l'impiego di tecniche avanzate di produzione additiva, come la sinterizzazione laser diretta dei metalli (DMLS) o la fusione laser selettiva (SLM), che permettono di realizzare direttamente il dispositivo a partire dal modello digitale 3D. Tale telaio provvisorio viene sottoposto a successive lavorazioni meccaniche, necessarie per rifinire le superfici e ottenere la precisione richiesta.

In conclusione, gli impianti sottoperiostei di nuova generazione possono adattarsi perfettamente all'anatomia del paziente e, grazie alle loro caratteristiche superficiali,

possono favorire l'osteointegrazione. In pazienti selezionati tali impianti presentano diversi vantaggi, tra cui la possibilità di essere posizionati mediante un'unica procedura chirurgica e il fatto di rappresentare una valida alternativa riabilitativa nei casi in cui gli impianti endossei hanno fallito (Ângelo et al., 2020; Sánchez-Labrador et al., 2025).



Figura 5. *Rappresentazione di un impianto sottoperiosteo di ultima generazione (https://www.dottoramoroso.it/denti-fissi-3/*).

3. MATERIALI E METODI

3.1. Colture cellulari

Per questo studio *in vitro* sono state utilizzate due linee cellulari di osteosarcoma umano MG-63 e SaOS-2 (ATCC, Rockville, MD, USA), ampiamente utilizzate come modello cellulare. Le cellule sono state coltivate in fiasche per coltura T25 cm^2 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium ad alto contenuto di glucosio (DMEM High Glucose, 4.5 g/L; Euroclone, Milano, Italia), con l'aggiunta di 10% di siero fetale bovino (FBS) e con penicillina/streptomicina 1X (Euroclone, Milano, Italia). Le colture cellulari sono state mantenute a 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO_2.

3.2. Modello sperimentale

Le cellule sono state coltivate direttamente sui supporti in lega di titanio per valutare la risposta biologica a differenti modifiche di superficie. Nello specifico, le cellule sono state seminate su dischi realizzati in lega di titanio Ti6Al4V di grado 5, con diametro di 10 mm. Questi sono stati prodotti da New Ancorvis S.r.l. (Bargellino di Calderara di Reno, Italia) e successivamente sottoposti a differenti procedure di finitura superficiale presso Al Ti Color S.r.l. (Piazzola sul Brenta, Italia). In base al trattamento superficiale applicato, sono stati definiti cinque gruppi sperimentali (Tabella 1): gruppo di controllo (CTRL), che corrisponde a dischi non sottoposti ad alcun tipo di trattamento superficiale; gruppo EE, che rappresenta i dischi sottoposti a lucidatura mediante elettroerosione; gruppo ES, che comprende dischi sottoposti a un trattamento combinato di mordenzatura e sabbiatura; gruppo ATcs, il quale include dischi sottoposti ad una modificazione superficiale recentemente sviluppata da Al Ti Color, soggetta a vincoli di riservatezza; gruppo CA, comprendente dischi sottoposti ad anodizzazione colorata.

	TRATTAMENTI
Dischetto 1	Ti6Al4V grezzo e decontaminato
Dischetto 2	Elettroerosione con finitura lucida
Dischetto 3	Mordenzato e sabbiato
Dischetto 4	Nuovo rivestimento brevettato per impianti sottoperiostei
Dischetto 5	Grezzo, pulito e sottoposto a ossidazione anodica

Tabella 1. *Tipologie di finiture superficiali applicate ai dischi di titanio di grado 5 medicale oggetto di studio.*

3.3. Microscopia elettronica a scansione (SEM) e spettroscopia a dispersione di energia dei raggi X (EDS)

3 x 10^4 cellule MG-63 sono state seminate sui supporti di titanio posizionati in piastre da 24 pozzetti e incubate per 72 ore. Successivamente, il terreno di coltura è stato scartato e i campioni sono stati fissati in glutaraldeide 2,5% (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) in tampone di cacodilato di sodio 0,1 M (Merck, Darmstadt, Germania), pH 7,4. I campioni sono stati quindi sottoposti a post-fissazione con tetrossido di osmio all'1% (Merck, Darmstadt, Germania) e disidratati totalmente mediante concentrazioni crescenti di etanolo ed esametildisilazano (HMDS) (Merck, Darmstadt, Germania).

I campioni trattati sono stati montati su supporti di alluminio e sottoposti a metallizzazione mediante deposizione di oro, utilizzando un metallizzatore Emitech K550 (Quorum Technologies, Laughton, Regno Unito). Successivamente, sono stati analizzati con un microscopio elettronico a scansione (SEM) Zeiss SUPRA 40 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania) dotato di uno spettrometro a dispersione di energia di raggi X (EDS) Bruker Quantax 200 Z10 (Bruker, Berlino, Germania), per la valutazione dello stato di adesione, della morfologia cellulare e per la determinazione della distribuzione degli elementi chimici.

3.3.1. Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

Il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) appartiene alla famiglia dei microscopi a scansione di sonda**.** Quest'ultima è costituita da un fascio di elettroni collimato, con energie comprese tra 1 keV e 40 keV.

I blocchi funzionali che compongono un SEM sono (Figura 6):

- Sorgente elettronica*:* produce il fascio elettronico per mezzo di un catodo, mantenuto ad un potenziale fortemente negativo che provoca l'accelerazione delle particelle;
- Sistema di lenti: si tratta di lenti elettromagnetiche a simmetria assiale, costituite da un nucleo cilindrico in ferro che alloggia un avvolgimento di ferro. Al passaggio della corrente si instaura un campo elettromagnetico orientato parallelamente all'asse ottico della lente, il quale, interagendo con la carica degli elettroni, ne curva la traiettoria;

- Camera di vuoto: ha la funzione di rimuovere l'aria e i gas presenti sia nella colonna in cui si genera il fascio sia nella camera dove si trova il campione. Questa condizione di vuoto è indispensabile per permettere agli elettroni di viaggiare indisturbati;
- Bobine di scansione: consentono di mappare la superficie del campione con il fascio, lungo due assi ortogonali. La velocità del processo può essere regolata dall'operatore e avviene in perfetto accordo con il sistema che elabora l'immagine;
- Lente obiettivo: converge il fascio elettronico sul campione;
- Detector: intercettano i diversi segnali emessi dal campione;
- Sistema di conversione segnale-immagine: elabora il segnale e consente di visualizzare l'immagine risultante su un monitor;
- Camera porta-campione: camera all'interno della quale viene alloggiato il campione.

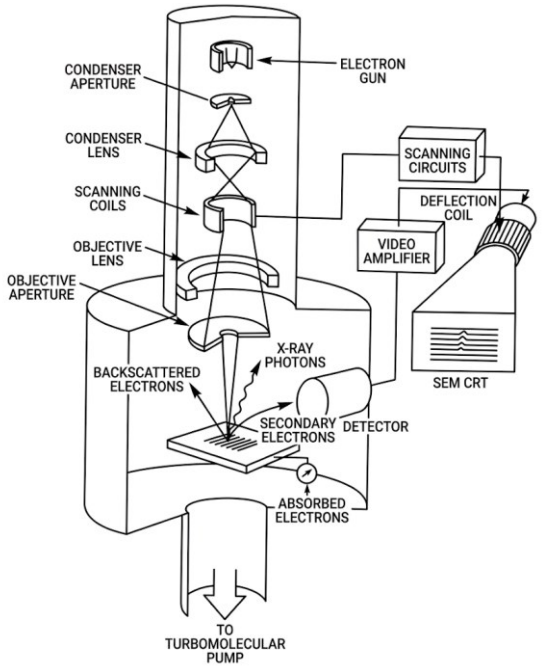


***Figura 6**: Rappresentazione schematica del SEM*

La sorgente elettronica del SEM presenta dimensioni contenute, lenti più compatte e di numero ridotto rispetto al TEM (Microscopio Elettronico a Trasmissione), poiché il fascio viene accelerato a energie inferiori. Il fascio di elettroni che viene diretto verso il campione funge da strumento principale di analisi, paragonabile ad una sonda esplorativa.

Per garantire che l'immagine finale sia dettagliata e nitida, questo fascio deve essere di un diametro il più possibile ridotto, tipicamente nell'ordine di 1-10 nm, poiché su esso si basa la risoluzione delle immagini dello strumento. L'esplorazione della superficie campionaria è ottenuta deviando la sonda mediante le bobine di scansione, lungo i due assi ortogonali x e y: la deviazione lungo x è relativamente rapida, quella lungo y più lenta. Ne consegue un movimento a griglia rettangolare, che permette di esplorare l'intera area punto per punto. Il fascio si muove rapidamente in orizzontale (asse x) per tracciare una linea retta, dopodiché torna all'inizio ma si sposta leggermente in verticale (asse y) per iniziare la riga successiva. Questo processo si ripete ciclicamente per coprire e analizzare l'intera area rettangolare.

L'esito della scansione compare sotto forma di immagine sul display attraverso un sistema a tubo a raggi catodici (CRT): a ogni punto esplorato sul campione corrisponde esattamente un pixel sull'immagine finale, che appare in scala di grigi a causa dei cambiamenti di voltaggio registrate dal rivelatore in corrispondenza delle variazioni del campione. Questo processo sfrutta principalmente due tipi di segnali noti come elettroni secondari (SE) ed elettroni retrodiffusi (BSE).

3.3.2. Spettroscopia a Dispersione di Energia (EDS)

La Spettroscopia a Dispersione di Energia (EDS), denominata anche microanalisi a dispersione di energia (Energy Dispersive Spectroscopy), è una tecnica di analisi chimica che si basa sull'identificazione degli elementi che formano un campione attraverso la misurazione dei raggi X specifici che essi emettono. L'impatto tra il fascio di elettroni e il materiale da analizzare, genera molteplici segnali, inclusi raggi X e altri fotoni: i primi sono caratteristici dal campione e possiedono energie peculiari degli elementi costituenti; mentre altri fotoni non rilevanti creano un livello di segnale continuo alla base dello spettro (rumore di fondo).

Quando un elettrone primario colpisce il campione, esiste una probabilità che subisca una diffusione anelastica da parte degli elettroni atomici degli orbitali più profondi: l'elettrone atomico migra verso un guscio più esterno oppure lascia l'atomo, dando origine a una lacuna elettronica. Quando il fascio dello strumento urta il campione, c'è una probabilità che l'elettrone incidente urti un elettrone interno dell'atomo perdendo energia (diffusione

anelastica). Questo fa sì che l'elettrone atomico venga espulso o spinto verso un orbitale più esterno, lasciando una lacuna elettronica all'interno della struttura dell'atomo. Un atomo portato in uno stato eccitato tende sempre a ritornare in condizioni di stabilità riempiendo tale lacuna con un elettrone proveniente dagli involucri più esterni: l'elettrone effettua così una transizione energetica verso il guscio più profondo, liberando energia sotto forma di fotoni X, la cui energia caratteristica è esprimibile mediante la relazione:

$$\Delta E = E2 - E1 = h\nu$$

dove E2 ed E1 sono le energie caratteristiche del guscio più esterno e di quello più interno, h la costante di Planck e ν la frequenza. Tale energia dipende dal numero atomico Z e dai numeri quantici dei livelli energetici interessati nella transizione elettronica.

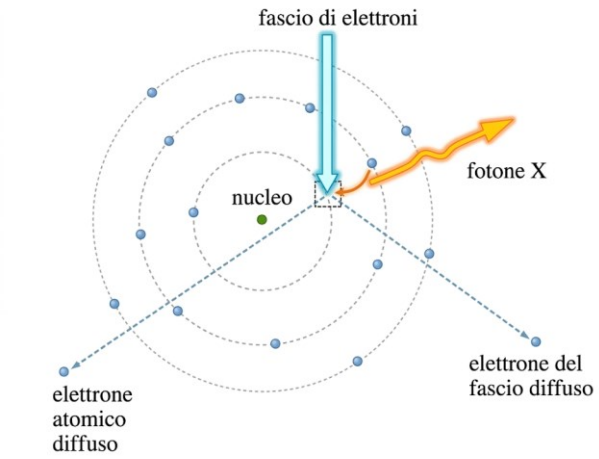


***Figura** 7: Interazione del fascio di elettroni prodotto dallo strumento con un atomo del campione.*

Poiché i raggi X emessi hanno un livello di energia unico e specifico per ogni elemento chimico, misurandola è possibile capire esattamente da quali elementi è composto il campione analizzato. Per farlo, la strumentazione si avvale di un apposito rivelatore che cattura i fotoni X generati dal materiale, un amplificatore e un analizzatore di segnale. Poiché i raggi X non possono essere deviati, il rivelatore deve essere collocato nel campo visivo del campione, ad una distanza variabile in funzione dello strumento impiegato. Mediante la microanalisi EDS viene conteggiato il numero di fotoni X emessi a ciascuna energia, ricavandone uno spettro: a ogni picco di intensità, corrisponde un'energia precisa

che identifica in modo univoco un determinato elemento chimico, permettendo così di ricavare la composizione del campione.

3.4. Determinazione della concentrazione proteica totale mediante saggio di Bradford

La concentrazione proteica totale dei campioni è stata determinata utilizzando il saggio di Bradford basato sulla capacità del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 di legarsi alle proteine. Il legame del colorante alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento verso 595 nm e lo sviluppo di una colorazione blu. L'intensità della colorazione sviluppata è proporzionale alla quantità di proteine presenti nel campione (Kielkopf et al., 2020).

Pellet cellulari corrispondenti a $2{,}0 \times 10^6$ cellule sono stati lisati in 100 µL di tampone di estrazione freddo, costituito da soluzione salina tamponata con fosfato (PBS, pH 7,4) integrata con 1% di Nonidet P-40, 0,5% di deossicolato di sodio, 0,1% di SDS, 1 mM di ortovanadato di sodio, 1 mM di fluoruro di fenilmetilsulfonile (PMSF) e 2 µg/mL di aprotinina, mediante passaggi ripetuti attraverso un ago per siringa da 30-gauge per garantire la completa omogeneizzazione del campione. Successivamente, i lisati sono stati separati mediante centrifugazione a 16.000× g per 10 min a 4 °C e i surnatanti ottenuti sono stati raccolti per le successive analisi.

Per determinare la concentrazione proteica del campione è stata preparata una curva di calibrazione utilizzando come standard albumina sierica bovina (BSA) a concentrazione nota (0,1 mg/mL). Per ciascuno standard e per ciascun campione è stato prelevato un volume noto di soluzione, al quale è stato aggiunto il reattivo di Bradford e l'assorbanza è stata misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm.

I valori di assorbanza ottenuti per gli standard sono stati riportati sull'asse delle ordinate (Y), mentre le corrispondenti concentrazioni di BSA sono state riportate sull'asse delle ascisse (X), ottenendo la curva di calibrazione. La concentrazione proteica dei campioni incogniti è stata quindi determinata mediante interpolazione dei rispettivi valori di assorbanza sulla curva di calibrazione.

3.5. Western Blot

L'analisi mediante Western blot è stata eseguita caricando 30 μg di proteine totali per ciascun campione su gel di poliacrilammide al 12,5%. In seguito, la separazione delle proteine è stata effettuata mediante elettroforesi in presenza di dodecilsolfato di sodio (SDS-PAGE).

Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su membrane di fluoruro di polivinilidene (PVDF). Dopo il trasferimento, le membrane sono state bloccate utilizzando EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e quindi incubate overnight a 4 °C con gli anticorpi primari. Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali di topo diretti contro DMP1 umano (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) e SPARC (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), e anticorpi policlonali di coniglio diretti contro COL1A1 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) e β-actina (1:200; Merck, Milano, Italia), quest'ultima utilizzata come controllo. Dopo una serie di lavaggi con soluzione di lavaggio costituita da Tween 20 0.05% e PBS 1X, le membrane sono state incubate a temperatura ambiente per 1 ora con anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano (HRP). Sono stati utilizzati anticorpi IgG di capra anti-topo (1:5000) o IgG di capra anti-coniglio (1:150000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Le bande immunoreattive sono state visualizzate tramite chemiluminescenza, utilizzando il substrato SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Fisher Scientific) e rilevate tramite il sistema di imaging ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories). Il software ImageJ v. 1.46 (Rasband, WS, ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, https://imagej.net/ij/, 1997–2018) è stato utilizzato per quantificare l'intensità del segnale.

Per ciascuna condizione sperimentale, gli estratti proteici ottenuti da tre esperimenti indipendenti sono stati uniti in un unico pool e successivamente analizzati tramite western blot. La quantificazione densitometrica delle bande è stata eseguita in triplicato sulla medesima membrana.

3.6. Microscopia a fluorescenza

L'espressione della proteina DMP1 è stata valutata attraverso analisi di microscopia a fluorescenza e microscopia confocale. 3×10^4 cellule MG-63 sono state seminate sulle

superfici in titanio e coltivate per 72 ore in condizioni standard. Terminato il periodo di incubazione, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule adese ai supporti sono state fissate con formaldeide al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, è stata eseguita l'analisi in immunofluorescenza per rilevare la DMP1. In particolare, le cellule sono state incubate con un anticorpo primario specifico diretto contro DMP1 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), seguito da anticorpo secondario coniugato con fluoroforo AlexaFluor 488 (Thermo Fisher Scientific), secondo le indicazioni del produttore. Inoltre, la componente actinica del citoscheletro è stata marcata con falloidina coniugata con Alexa Fluor Plus 647 (Thermo Fisher Scientific, USA). Il fluoroforo è stato diluito 1:400 in PBS 1X e per ciascun disco sono stati utilizzati 700 µL di soluzione colorante. I campioni sono stati incubati in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente, quindi sottoposti a tre lavaggi con PBS 1X per rimuovere il colorante non legato.

È stata poi effettuata una controcolorazione dei nuclei utilizzando ProLong Glass Antifade Mountant con NucBlue (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Quindi, 50 µL di mezzo di montaggio sono stati applicati su ciascun vetrino e i dischi di titanio sono stati posizionati con la superficie con le cellule adese rivolta verso il mezzo di montaggio. I campioni sono stati incubati 15 minuti a temperatura ambiente per garantire il corretto montaggio e sono stati analizzati mediante il microscopio confocale Nikon A1R (Nikon Corporation, Tokyo, Giappone), dotato di un obiettivo 20× a lunga distanza di lavoro adatto all'acquisizione di immagini su supporti di spessore elevato.

L'acquisizione e l'elaborazione delle immagini sono state effettuate utilizzando il software NIS-Elements (versione 5.21.00; Nikon).

3.7. Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP)

Per il dosaggio dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP), è stato utilizzato Alkaline Phosphatase Assay Kit (MAK447, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Il saggio si basa sull'idrolisi da parte dell'ALP del p-nitrofenilfosfato (pNPP), con formazione di un prodotto di colore giallo, la cui assorbanza massima è a 405 nm. La velocità della reazione, misurata allo spettrofotometro, è direttamente proporzionale all'attività enzimatica dell'ALP presente nel campione. In particolare, i dischi sono stati posti in una

piastra a 24 pozzetti e $3x10^4$ cellule SaOS-2 sono state seminate sulla loro superficie e incubate per 7 giorni a 37°C con il 5% di CO_2, con cambio terreno ogni 48h. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state staccate dai dischi mediante la tripsina e lisate con Triton X-100 al 0,2% in acqua deionizzata. Parallelamente è stata preparata la Working Reagent necessaria, costituita da 200 µl di Assay Buffer, 5 µl di acetato di magnesio (0,2 M) e 2 µl di pNPP liquido (1 M).

Terminata la lisi cellulare, in una piastra da 96 pozzetti sono stati inseriti 50 µl di lisato, a cui sono stati aggiunti 150 µl di working reagent.

La densità ottica (OD) è stata misurata a 405 nm immediatamente (T_0) e di nuovo dopo 4 minuti (T_4), utilizzando un lettore di piastra ELISA Synergy HTX (BioTek, Santa Clara, CA, USA).

L'attività della ALP è stata calcolata secondo la seguente formula, come indicato dalle istruzioni del produttore:

$$\text{ALP (IU/L or µmol/(L·min))} = \frac{(OD_{T4} - OD_{T0}) \times RxnVol \times 35{,}3}{(OD_{cal} - OD_{Blank}) \times SmplVol \times T}$$

dove:

OD_{T4} = valore di OD a 405nm del campione a 4 minuti

OD_{T0} = valore di OD a 405 nm del campione a 0 minuti

OD_{cal} = valore di OD a 405 nm del calibratore

OD_{Blank} = valore di OD a 405 nm del bianco

RxnVol = volume finale di reazione (200 µl)

SmplVol = quantità di campione (µl) usato nella reazione

T = tempo di reazione (4 minuti)

3.8. Analisi statistica

I risultati sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Le differenze tra i gruppi (ognuno consistente di tre campioni) sono state determinate mediante il test ANOVA one-way.

4. RISULTATI

4.1. Microscopia elettronica a scansione (SEM) e spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS)

L'analisi al SEM ha evidenziato l'adesione delle cellule MG-63 su tutte le superfici in titanio analizzate. Le cellule, infatti, appaiono strettamente adese ai substrati e distribuite sulla loro superficie, sebbene siano presenti differenze nella morfologia cellulare e nelle modalità di interazione con i diversi supporti.

La figura 8 mostra come le cellule MG-63 siano a stretto contatto e abbiano colonizzato la superfice di tutti i substrati, anche se con una morfologia variabile a seconda della superficie. Nello specifico, sulla superficie CTRL le cellule MG-63 mostrano un allineamento parziale e un aspetto fusiforme caratteristico, con brevi protrusioni cellulari indicative di una buona adesione al substrato. Sulla superficie EE, è stata notata una denità cellulare inferiore associata ad una maggiore variabilità morfologica. Infatti, la forma di alcune cellule era fusiforme, mentre altre avevano una struttura poligonale e schiacciata, suggerendo una maggiore aderenza alla superficie del materiale dentale. L'analisi al SEM dei dischi sottoposti a sabbiatura e mordenzatura acida ha messo in luce un numero maggiore di cellule di grandi dimensioni, organizzate in una rete interconnessa e che presentano delle increspature della membrana. Le cellule distribuite sulla superficie ATcs formano uno strato regolare e omogeneo di cellule piatte e poligonali, strettamente aderenti al substrato. Il passaggio ad una morfologia appiattita e diffusa è legato intrinsecamente alla forza di adesione, che riveste un ruolo fondamentale nell'osteointegrazione dell'impianto. Inoltre, il passaggio da una morfologia allungata ad una forma più ampia rappresenta un segnale di differenziamento cellulare. Tale osservazione è stata ulteriormente supportata dalla presenza di strutture simili a dei noduli mineralizzati nell'ambiente pericellulare. Infine, sulla superficie CA sono state osservate delle reti cellulari dense, costituite da elementi poligonali e fusiformi, ma con la presenza anche di cellule di forma tondeggiante e quindi meno aderenti al substrato.

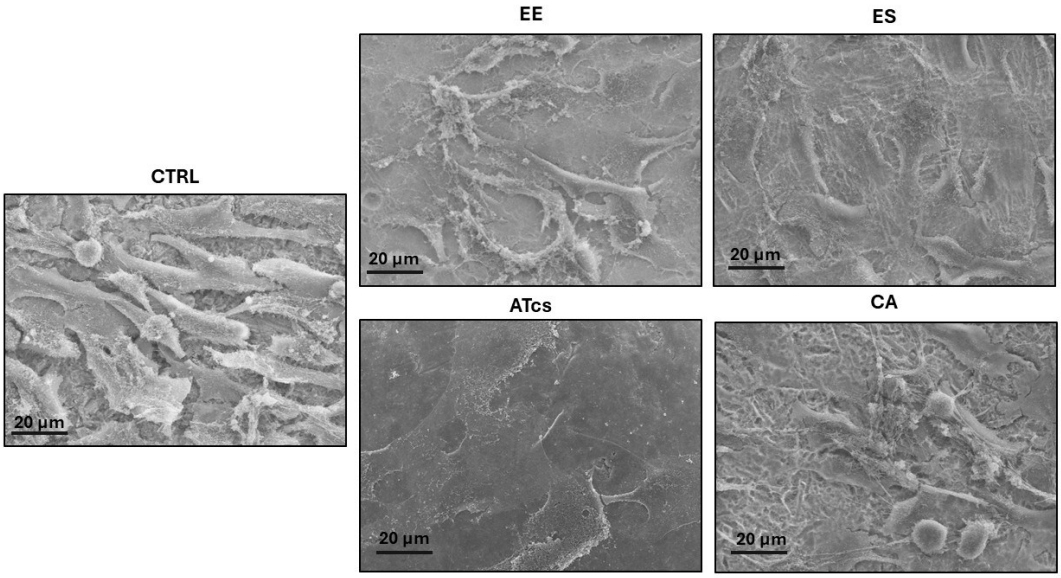


Figura 8: *Immagini SEM rappresentative dei dischi CTRL, EE, ES, ATcs e CA colonizzati dalle cellule MG-63. Su ogni substrato analizzato si rileva un'efficace diffusione e una stretta adesione delle cellule simil-osteoblastiche.*

Per esaminare la composizione degli elementi dei depositi mineralizzati presenti sulla superficie del disco ATcs, è stata condotta un'analisi EDS (Figura 9). L'immagine ottenuta al SEM ha rivelato, all'interno della matrice extracellulare, la presenza di una struttura arrotondata, caratterizzata da una superficie porosa, che ha l'aspetto di un nodulo mineralizzato (A). Lo spettro EDS correlato (B) ha messo in evidenza la presenza predominante di fosforo (P) e di calcio (Ca), oltre al titanio (Ti) e ad altri elementi provenienti dal substrato, suggerendo così l'avvenuta deposizione di fosfato di calcio. La sovrapposizione delle mappe composizionali ha permesso di valutare la disposizione spaziale degli elementi nel campione. Di fatto, il Ti si trova distribuito sulla superficie (C) in maniera omogenea, mentre i segnali di Ca (D) e P (E) appaiono molto concentrati in corrispondenza della struttura nodulare. La mappa integrata (F) ha evidenziato la netta co-localizzazione di Ca e P dentro il nodulo, in linea con un accumulo minerale localizzato sulla superficie del disco. Il rapporto tra calcio e fosforo (Ca/P) è stato determinato utilizzando le percentuali atomiche ricavate dall'analisi EDS, risultando pari a 1,67, valore compatibile con l'intervallo del rapporto atomico caratteristico dell'idrossiapatite.

L'assenza di strutture mineralizzate analoghe sui dischi privi di cellule, come precedentemente osservato (Campagna et al., 2025) supporta l'ipotesi di un'origine biologica dei depositi rilevati. In sintesi, i risultati SEM-EDS evidenziano la capacità della superficie ATcs di sostenere l'adesione delle cellule MG-63 e di favorire la formazione di depositi extracellulari ricchi in calcio e fosforo, compatibili con processi di mineralizzazione della matrice extracellulare.

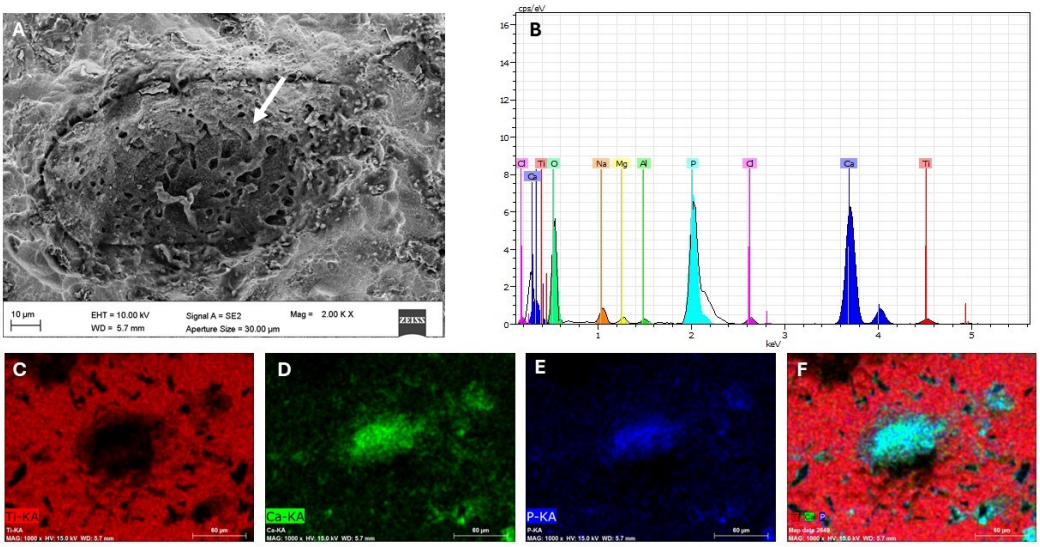


Figura 9: *Caratterizzazione tramite SEM-EDS del disco ATcs in seguito alla colonizzazione con cellule MG-63. Le micrografie indicano la presenza di aggregati mineralizzati (A) ricchi di calcio e fosforo nella zona pericellulare, confermati dai relativi spettri EDS (B). La mappatura elementale dimostra la concentrazione e la co-localizzazione (F) di Ca (D) e P (E) all'interno del nodulo, a fronte di una distribuzione uniforme del Ti (C) sulla superficie del materiale dentale.*

4.2. Valutazione dei marcatori di differenziazione osteogenica e di formazione della matrice extracellulare (ECM)

I marcatori più rappresentativi scelti per valutare la differenziazione delle cellule osteogeniche e la formazione della matrice extracellulare sono: DMP1, COL1A1 e SPARC. L'analisi mediante western blot ha evidenziato differenze nell'espressione delle proteine coinvolte nei processi di differenziazione osteogenica e nella formazione della matrice extracellulare (Figura 10). L'espressione di DMP1 è risultata maggiore nelle

cellule coltivate a contatto con le superfici ES, ATcs e CA rispetto alla superficie CTRL, indicando una maggiore espressione di questo marcatore.

COL1A1 ha mostrato un segnale più marcato nei campioni CTRL e EE, mentre la sua espressione è progressivamente diminuita in ES e ATcs, fino a risultare appena identificabile nelle cellule a contatto con la superfice CA.

Per quanto riguarda SPARC, i livelli di espressione sono risultati elevati in EE e CA, suggerendo una proliferazione cellulare attiva, mentre livelli di espressioni più bassi sono stati osservate in ATcs e ES.

I livelli di β-actina risultano comparabili tra i diversi campioni, indicando un carico proteico uniforme e consentendo di utilizzare tale proteina come controllo di caricamento.

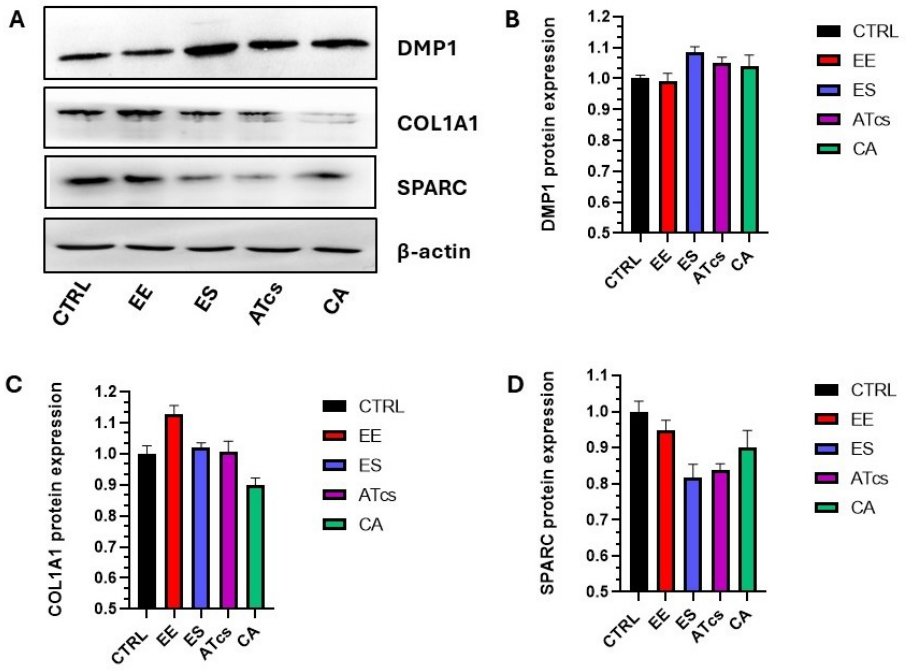


Figura 10: *Profili di espressione delle proteine osteogeniche nei gruppi CTRL, EE, ES, ATcs e CA mediante Western blot. (A) Bande di chemiluminescenza relative a DMP1, COL1A1 e SPARC; la β-actina è stata impiegata come controllo interno di caricamento. (B-D) Grafici di quantificazione densitometrica per DMP1 (B), COL1A1 (C) e SPARC (D), normalizzati in rapporto alla β-actina. I valori riportati sono espressi come media ± deviazione standard di tre repliche tecniche*.

4.3. Analisi mediante immunofluorescenza e microscopia confocale per la localizzazione subcellulare di DMP1

L'analisi condotta con immunofluorescenza ha evidenziato un segnale DMP1 ben definito, principalmente localizzato nel citoplasma delle cellule coltivate sulla superficie del disco. La marcatura di DMP1, controcolorata con falloidina per mettere in evidenza il citoscheletro di actina, è stata prevalentemente notata in cellule aggregate ed ha mostrato una distribuzione citoplasmatica caratterizzata da un pattern sia puntiforme sia parzialmente diffuso (Figura 11).

L'acquisizione di immagini attraverso Z-stack (Figura 11 - A) ha permesso di visualizzare il volume cellulare completo, confermando che la quantità di espressione di DMP1 rimaneva invariata in tutte le cellule risultate positive. Nell'immagine incentrata su un unico piano focale (Figura 11 - B), sono stati osservati rari casi di localizzazione nucleare di DMP1, confermati dalla controcolorazione del nucleo con Nuclear Blue.

Al contrario, la marcatura per DMP1 è risultata estremamente debole o quasi assente nei campioni CTRL ed EE, confermando la ridotta espressione della proteina già evidenziata dall'analisi Western blot.

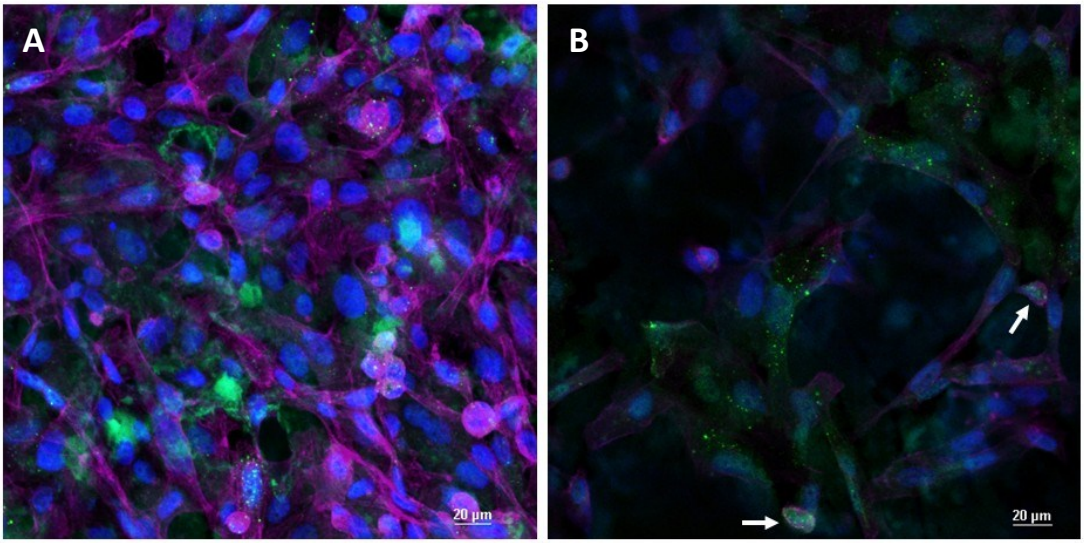


Figura 11: *Immagini rappresentative ottenute mediante analisi di immunofluorescenza e microscopia confocale eseguite sui dischi ES, ATcs e CA. La marcatura per DMP1 (verde) è localizzata principalmente a livello del citoplasma di numerose cellule (il colore magenta è ottenuto dalla falloidina, utilizzata come controcolorazione del citoscheletro). (A): è stato*

acquisito uno Z-stack per visualizzare le cellule nel loro complesso e descrivere in modo più dettagliato il livello di espressione di DMP1. Il pattern di colorazione è risultato sia puntiforme sia diffuso ed è stato osservato principalmente a livello del citoplasma di gruppi di cellule presenti sulla superficie dei dischetti. (B): singolo piano focale per descrivere più dettagliatamente la localizzazione subcellulare di DMP1. Inoltre, sono visibili alcune rare colorazioni a livello nucleare (frecce bianche). I nuclei sono stati controcolorati con Nuclear Blue.

4.4. Attività della fosfatasi alcalina (ALP)

L'attività della fosfatasi alcalina (ALP) è stata determinata nelle cellule SaOS-2 coltivate sulle cinque differenti superfici in titanio ed espressa come fold change rispetto al controllo (CTRL) (Figura 12). L'attività della ALP è aumentata di 1,03 ± 0.033, 1,10 ± 0.092, 1,85 ± 0.056 e 1,74 ± 0.044 volte, rispettivamente per EE, ES, ATcs e CA. Nel complesso, le superfici ATcs e CA hanno mostrato i valori di attività dell'ALP più elevati, corrispondenti ad un incremento di circa 85% e 74% rispetto al controllo, rispettivamente (Figura 12).

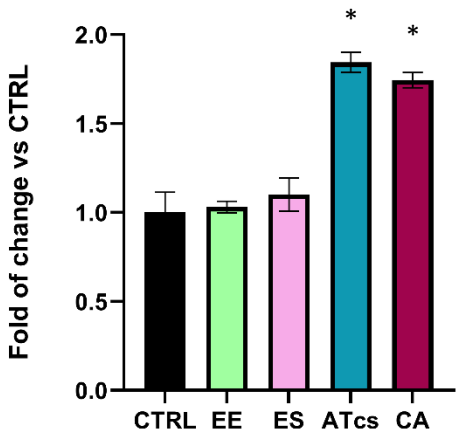


***Figura 12**: Attività della fosfatasi alcalina nelle cellule SaOS-2 coltivate sui diversi dischi in titanio. Attività enzimatica determinata dopo 7 giorni di coltura mediante saggio spettrofotometrico. I risultati sono espressi come media ± deviazione standard (SD) di tre esperimenti indipendenti, *p < 0.05.*

5. DISCUSSIONE

Questo studio offre una descrizione dettagliata del modo in cui i diversi trattamenti superficiali, applicati ai materiali dentali in lega Ti6Al4V, orientano il comportamento di cellule simil-osteoblastiche, non soltanto nelle fasi iniziali di adesione e crescita cellulare, ma anche nella sintesi, maturazione e mineralizzazione della matrice extracellulare (ECM). In uno studio precedente sono stati pubblicati dati preliminari a sostegno della capacità di tali cellule di aderire e colonizzare i dischi in Ti6Al4V sottoposti a diversi trattamenti superficiali (Campagna et al., 2025).

In questo elaborato, sebbene l'indagine al SEM attesti la capacità di tutte le superfici esaminate di favorire l'adesione e la propagazione delle cellule MG-63, è possibile osservare come le differenze qualitative nella morfologia cellulare e nella deposizione della matrice indichino che la composizione chimica e la topografia superficiale dei supporti condizioni in modo decisivo l'avanzamento del differenziamento osteogenico.

Nello specifico la superficie ATcs sembra in grado di indurre una risposta biologica meno orientata alla proliferazione e più diretta verso la maturazione della matrice e la sua mineralizzazione, una combinazione vantaggiosa che potrebbe garantire un'integrazione stabile dell'impianto sottoperiosteo. I dati dell'analisi al SEM-EDS offrono una prima evidenza sperimentale a favore di questa interpretazione: l'osservazione di noduli ricchi di calcio e fosforo sulla superficie ATcs suggerisce infatti che sia avvenuta la formazione di matrice extracellulare mineralizzata, escludendo una precipitazione di sali aspecifica. Tali risultati sono in linea con indagini ultrastrutturali precedenti, che hanno mostrato come il riscontro di noduli ricchi di calcio e fosfato rappresenti un tratto distintivo di una mineralizzazione attiva della matrice in colture di osteoblasti (Addison et al., 2015; Nitiputri et al., 2016; Nollet et al., 2014; Hasegawa et al., 2017).

La presenza di questi depositi dimostra che la superficie ATcs non si limita a garantire la vitalità degli osteoblasti, ma promuove attivamente le condizioni biochimiche necessarie per la nucleazione dell'idrossiapatite, passaggio cruciale per un'osteointegrazione funzionale.

La valutazione dell'espressione di COL1A1 chiarisce ulteriormente lo stadio di maturazione raggiunto dalle cellule cresciute sui diversi supporti. Infatti, l'espressione di COL1A1 risulta essere superiore sulle superfici CTRL ed EE e progressivamente

inferiore sui dischi ES e ATcs. Più che segnalare un'osteogenesi alterata, tale riduzione, unita all'aumento dell'espressione di DMP1 e alla presenza di depositi minerali ricchi di calcio e fosfato, testimonia la transizione delle cellule verso un fenotipo più maturo. Numerosi lavori hanno evidenziato che l'espressione di COL1A1 culmina nelle fasi iniziali del differenziamento osteoblastico e regredisce progressivamente nel momento in cui le cellule si avviano verso la maturazione della matrice e la deposizione minerale (Huang et al., 2007; Twine et al., 2014; Kalajzic et al., 2003). Pertanto, i livelli più bassi di COL1A1 rilevati sulla superficie ATcs suggeriscono che le cellule simil-osteoblastiche potrebbero aver già completato la fase iniziale di deposizione del collagene ed essere entrate in uno stadio di maturazione più avanzato.

La proteina SPARC, denominata anche osteonectina, apporta ulteriori chiarimenti sullo stato di maturazione della matrice extracellulare. Essa risulta infatti abitualmente molto espressa nei tessuti che si trovano in una fase di rimodellamento, dove partecipa all'organizzazione della matrice senza essere un elemento strutturale vero e proprio (Zhu et al., 2020). I livelli di SPARC raggiungono il picco nelle prime tappe del differenziamento e calano progressivamente con la maturazione delle cellule, che iniziano ad esprimere i marcatori propri degli osteoblasti maturi (Mundlos et al., 1992; Delany et al., 2003). I valori elevati di SPARC osservati sulle superfici EE e CA sono in linea con un microambiente biologicamente attivo e orientato al ricambio cellulare, in accordo con quanto riportato in lavori precedenti che associano l'espressione di questa proteina con l'attività osteoblastica iniziale e con il turnover della matrice (Mundlos et al., 1992; Delany et al., 2003). Invece, la ridotta espressione di SPARC sulla superficie ATcs indica una riduzione del turnover della matrice e della proliferazione cellulare, che favorisce la stabilità della matrice già depositata. Ciò riveste un interesse particolare in ambito implantare, dal momento che un rimodellamento eccessivo o prolungato a livello dell'interfaccia osso-impianto può compromettere la stabilità futura di quest’ultimo.

È da precisare che l'espressione di COL1A1 e SPARC non dipende solo dal grado di maturazione osteogenica, ma anche variabili legate al substrato, come le interazioni cellula-superficie e i meccanismi di meccanotrasduzione, possono concorrere alla regolazione di queste proteine. Nello specifico, è stato visto che la rugosità di superficie condiziona il comportamento degli osteoblasti e la produzione di matrice extracellulare (Gittens et al., 2013; Riedel et al., 2024).

Tra i marcatori esaminati in questo lavoro, la DMP1 si rivela essere quello che fornisce più informazioni riguardo il grado di maturazione osteogenica; infatti tale proteina svolge un ruolo decisivo nel differenziamento tardivo degli osteoblasti, nella maturazione degli osteociti e nel controllo della mineralizzazione (Narayanan et al.,2003). Essa è coinvolta attivamente sia nell'omeostasi del fosfato che nella formazione dei cristalli di idrossiapatite, e la sua espressione è strettamente legata alla transizione da osteoblasto a osteocita (Kalajzic et al., 2004; Zhang et al., 2018). Nel presente lavoro di tesi è stato rilevato un marcato aumento dell'espressione di DMP1 nelle cellule cresciute sulla superficie ATcs, come evidenziato sia dal saggio Western blot che dall'immunofluorescenza. Questo risultato è concorde con quanto riportato in lavori precedenti, che indicano la DMP1 come un marcatore tardivo del differenziamento osteogenico e della mineralizzazione (Narayanan et al., 2003; Kalajzic et al., 2004; Zhang et al., 2018) e dimostra che tale trattamento superficiale induce la maturazione osteogenica, anziché limitarsi a sostenere il differenziamento iniziale.

La distribuzione di DMP1 – prevalentemente citoplasmatica e pericellulare, come evidenziato dalla microscopia confocale – è coerente con il suo ruolo nel processo di mineralizzazione, nel corso del quale la proteina viene secreta e incorporata nell'ambiente extracellulare per regolare la nucleazione e l'accrescimento dei cristalli (Narayanan et al., 2003). Il riscontro occasionale di DMP1 nel nucleo supporta recenti ipotesi scientifiche secondo cui essa potrebbe avere un ruolo attivo nella regolazione delle funzioni intracellulari nel corso del differenziamento osteocitico.

La relazione inversa rilevata fra l'espressione di COL1A1/SPARC e quella di DMP1 sulle diverse superfici suggerisce che le varie fasi del processo di formazione dell’osso siano influenzate dalle caratteristiche del supporto. In particolare, mentre le superfici CTRL ed EE sembrano privilegiare le fasi precoci della produzione e del rimodellamento della matrice, la superficie ATcs sembra al contrario velocizzare la transizione verso un fenotipo più maturo e orientato alla formazione di matrice mineralizzata.

Relativamente alla fosfatasi alcalina, tale enzima è coinvolto nella deposizione e nella maturazione della matrice, raggiungendo i massimi livelli nel momento in cui la mineralizzazione ha inizio (Ledda et al., 2022). Per l'analisi di questo parametro sono state utilizzate le cellule SaOS-2, poiché presentano il fenotipo osteoblastico più maturo e, a differenza di altri modelli di osteosarcoma, sono caratterizzate da un'attività della

fosfatasi alcalina rilevabile nella quasi totalità della popolazione cellulare (Pautke et al., 2004). Nel presente lavoro di tesi l'attività della ALP, valutata dopo 7 giorni di coltura, è risultata moderatamente aumentata sulle superfici EE e ES, mentre gli incrementi più marcati sono stati osservati sulle superfici ATcs e CA. Questo dato è coerente con i risultati ottenuti nelle cellule MG-63 coltivate sui dischi ATcs: la riduzione dell'espressione di COL1A1 e SPARC, l'aumento dell'espressione di DMP1, l'elevata attività ALP e la presenza di depositi minerali delineano infatti nel loro complesso un profilo cellulare più maturo e orientato verso la fase di mineralizzazione.

L'insieme dei marker molecolari osservati, unitamente alla dimostrazione della formazione di depositi di calcio e fosfato, suggeriscono che la superficie ATcs instaura un microambiente favorevole per un'osteointegrazione funzionale. Nell'ottica clinica e traslazionale, tali riscontri assumono un particolare rilievo per le applicazioni implantari sottoperiostee. A differenza dei dispositivi endossei, gli impianti sottoperiostei si basano principalmente su un'integrazione rapida e stabile a livello della superficie ossea, anziché su un ancoraggio intraosseo profondo. Sebbene la superficie ES abbia indotto livelli più alti di espressione di DMP1 e sul supporto CA sia stata rilevata un'elevata attività di ALP, la superficie ATcs ha promosso un profilo osteogenico più bilanciato, contraddistinto da una regolazione coordinata dei marcatori e dalla formazione di matrice mineralizzata.

Questo indica che, sulla superficie ATcs, la contemporanea ed elevata presenza di ALP (un marcatore il cui picco precede la mineralizzazione) e DMP1 (un marcatore del differenziamento tardivo) sia legata alla maturazione osteoblastica e alla mineralizzazione della matrice extracellulare, anziché essere un evento isolato.

Una superficie in grado di supportare una progressione controllata ed omogenea verso le fasi avanzate dell'osteogenesi favorisce un ambiente biologico propizio per la formazione di un'interfaccia osso-impianto, riconosciuta come uno dei fattori determinanti della stabilità implantare. Tuttavia, per stabilire se tali effetti possano garantire una migliore stabilità meccanica ed esiti clinici duraturi, sono indispensabili approfondimenti *in vivo* e di natura biomeccanica.

6. CONCLUSIONI

I risultati di questo studio indicano che i differenti trattamenti superficiali dei dischi in lega di titanio Ti6Al4V (grado5) modulano il comportamento delle cellule simil-osteoblastiche e, in particolare, la produzione e la maturazione della matrice extracellulare. La superficie ATcs si distingue per un'espressione aumentata della proteina DMP1, una riduzione relativa di COL1A1 e SPARC ed un incremento dell'attività della fosfatasi alcalina. Questo insieme di dati suggerisce che il nuovo trattamento non si limiti a sostenere adesione e proliferazione, ma orienti le cellule verso un fenotipo cellulare più maturo in grado di formare matrice mineralizzata.

Dal punto di vista traslazionale, questi risultati sono promettenti per una applicazione nell'ambito dell'implantologia sottoperiostea, dove la stabilità dipende in misura particolare dalla qualità dell'integrazione a livello della superficie ossea. Sebbene siano necessari ulteriori studi *in vivo* e a lungo termine, i dati presentati forniscono una solida base biologica per l'utilizzo di questo nuovo trattamento superficiale al fine di migliorare la qualità dell'interfaccia osso-impianto e supportare una corretta osteointegrazione.

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Addison, W. N., Nelea, V., Chicatun, F., Chien, Y. C., Tran-Khanh, N., Buschmann, M. D., Nazhat, S. N., Kaartinen, M. T., Vali, H., Tecklenburg, M. M., Franceschi, R. T., & McKee, M. D. (2015). Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: an ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone. *Bone*, *71*, 244–256. https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.11.003
- Alcorta-Sevillano, N., Macías, I., Infante, A., & Rodríguez, C. I. (2020). Deciphering the Relevance of Bone ECM Signaling. *Cells*, *9*(12), 2630. https://doi.org/10.3390/cells9122630
- Ângelo, D. F., & Vieira Ferreira, J. R. (2020). The Role of Custom-made Subperiosteal Implants for Rehabilitation of Atrophic Jaws - A Case Report. *Annals of maxillofacial surgery*, *10*(2), 507–511. https://doi.org/10.4103/ams.ams_263_20
- Angelucci, C., Follenzi, A., Mattioli Belmonte, M. e Tamagnone, L., et al. (2025). Istologia Umana. Idelson-Gnocchi.
- Barberi, J., & Spriano, S. (2021). Titanium and Protein Adsorption: An Overview of Mechanisms and Effects of Surface Features. *Materials (Basel, Switzerland)*, *14*(7), 1590. https://doi.org/10.3390/ma14071590
- Bordbar-Khiabani, A., & Gasik, M., (2023). Electrochemical behavior of additively manufactured patterned titanium alloys under simulated normal, inflammatory, and severe inflammatory conditions. *Journal of Materials Research and Technology*,26, 356-370. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.07.113
- Campagna, R., Schiavoni, V., Rao, L., Bambini, F., Frontini, A., Sampalmieri, F., Salvolini, E., & Memé, L. (2025). Nuovo trattamento superficiale Ti6Al4V per impianti dentali sottoperiostei: valutazione della proliferazione cellulare simile agli osteoblasti e della risposta osteogenica. *Materiali* , *18* (6), 1234. https://doi.org/10.3390/ma18061234
- Cesur, N. P., Wagner, A., Tempfer, H., Lehner, C., Traweger, A., & Gehwolf, R. (2026). SPARC in musculoskeletal tissues: Linking matrix assembly to disease.

Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology, *147*, 102026. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2026.102026

- Chen, W., Zhu, W. Q., & Qiu, J. (2021). Impact of exogenous metal ions on peri-implant bone metabolism: a review. *RSC advances*, *11*(22), 13152–13163. https://doi.org/10.1039/d0ra09395e
- Dacic, S., Kalajzic, I., Visnjic, D., Lichtler, A. C., & Rowe, D. W. (2001). Col1a1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *16*(7), 1228–1236. https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.7.1228
- Delany, A. M., Kalajzic, I., Bradshaw, A. D., Sage, E. H., & Canalis, E. (2003). Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology*, *144*(6), 2588–2596. https://doi.org/10.1210/en.2002-221044
- Dermience, Michael (2010). Kashin-Beck disease: evaluation of mineral intake in young Tibetan children from endemic areas.
- Feng, J. Q., Ward, L. M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., Yu, X., Rauch, F., Davis, S. I., Zhang, S., Rios, H., Drezner, M. K., Quarles, L. D., Bonewald, L. F., & White, K. E. (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nature genetics*, *38*(11), 1310–1315. https://doi.org/10.1038/ng1905
- Gao, H., Huang, J., Wei, Q., & He, C. (2023). Advances in Animal Models for Studying Bone Fracture Healing. *Bioengineering*, *10*(2), 201. https://doi.org/10.3390/bioengineering10020201
- Gittens, R. A., Olivares-Navarrete, R., Cheng, A., Anderson, D. M., McLachlan, T., Stephan, I., Geis-Gerstorfer, J., Sandhage, K. H., Fedorov, A. G., Rupp, F., Boyan, B. D., Tannenbaum, R., & Schwartz, Z. (2013). The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta biomaterialia*, *9*(4), 6268–6277. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.12.002
- Golub, Ellis & Boesze-Battaglia, Kathleen. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*. 18. 444-448.

- Hasegawa, T., Yamamoto, T., Tsuchiya, E., Hongo, H., Tsuboi, K., Kudo, A., ... & Amizuka, N. (2017). Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. *Japanese Dental Science Review*, *53*(2), 34-45. https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.09.002.
- Huang, W., Yang, S., Shao, J., & Li, Y. P. (2007). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, *12*, 3068. https://doi.org/10.2741/2296
- Im, J.-S., Choi, H., An, H.-W., Kwon, T.-Y., & Hong, M.-H. (2023). Effects of Surface Treatment Method Forming New Nano/Micro Hierarchical Structures on Attachment and Proliferation of Osteoblast-like Cells. *Materials*, *16*(16), 5717. https://doi.org/10.3390/ma16165717
- Javed, F., Ahmed, H. B., Crespi, R., & Romanos, G. E. (2013). Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation. *Interventional medicine & applied science*, *5*(4), 162–167. https://doi.org/10.1556/IMAS.5.2013.4.3
- Kalajzic, I., Braut, A., Guo, D., Jiang, X., Kronenberg, M. S., Mina, M., Harris, M. A., Harris, S. E., & Rowe, D. W. (2004). Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone*, *35*(1), 74–82. https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.03.006
- Kalajzic, I., Kalajzic, Z., Hurley, M. M., Lichtler, A. C., & Rowe, D. W. (2003). Stage specific inhibition of osteoblast lineage differentiation by FGF2 and noggin. *Journal of cellular biochemistry*, *88*(6), 1168-1176. https://doi.org/10.1002/jcb.10459
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor protocols*, *2020*(4), 102269. https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269
- Kohli, N., Stoddart, J. C., & van Arkel, R. J. (2021). The limit of tolerable micromotion for implant osseointegration: a systematic review. *Scientific reports*, *11*(1), 10797. https://doi.org/10.1038/s41598-021-90142-5
- Ledda, M., Merco, M., Sciortino, A., Scatena, E., Convertino, A., Lisi, A., & Del Gaudio, C. (2022). Biological Response to Bioinspired Microporous 3D-Printed

Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *International journal of molecular sciences*, *23*(10), 5383. https://doi.org/10.3390/ijms23105383

- Li, J., Zheng, Y., Yu, Z., Kankala, R. K., Lin, Q., Shi, J., Chen, C., Luo, K., Chen, A., & Zhong, Q. (2023). Surface-modified titanium and titanium-based alloys for improved osteogenesis: A critical review. *Heliyon*, *10*(1), e23779. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23779
- Liedtke, D., Hofmann, C., Jakob, F., Klopocki, E., & Graser, S. (2020). Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase-A Gatekeeper of Physiological Conditions in Health and a Modulator of Biological Environments in Disease. *Biomolecules*, *10*(12), 1648. https://doi.org/10.3390/biom10121648
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G., & Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 757. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757
- Łoginoff, J., Majos, A., & Elgalal, M. (2024). The Evolution of Custom Subperiosteal Implants for Treatment of Partial or Complete Edentulism in Patients with Severe Alveolar Ridge Atrophy. *Journal of Clinical Medicine*, *13*(12), 3582. https://doi.org/10.3390/jcm13123582
- Lorusso, F., Ascani, G., Inchingolo, F., Tari, S., Bugea, C., & Scarano, A. (2023). The bone-implant contact and osseointegration of different implant surface treatment: the findings from a systematic review of literature. *Eur. J. Musculoskelet. Dis*, *13*, 95-117
- Mundlos, S., Schwahn, B., Reichert, T., & Zabel, B. (1992). Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, *40*(2), 283–291. https://doi.org/10.1177/40.2.1552170
- Narayanan, K., Ramachandran, A., Hao, J., He, G., Park, K. W., Cho, M., & George, A. (2003). Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca2+ store. *The Journal of biological chemistry*, *278*(19), 17500–17508. https://doi.org/10.1074/jbc.M212700200
- Narisawa, S., Yadav, M. C., & Millán, J. L. (2013). *In vivo* overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and

affects the phosphorylation status of osteopontin. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *28*(7), 1587–1598. https://doi.org/10.1002/jbmr.1901

- Nitiputri, K., Ramasse, Q. M., Autefage, H., McGilvery, C. M., Boonrungsiman, S., Evans, N. D., Stevens, M. M., & Porter, A. E. (2016). Nanoanalytical Electron Microscopy Reveals a Sequential Mineralization Process Involving Carbonate-Containing Amorphous Precursors. *ACS nano*, *10*(7), 6826–6835. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02443
- Nollet, M., Santucci-Darmanin, S., Breuil, V., Al-Sahlanee, R., Cros, C., Topi, M., Momier, D., Samson, M., Pagnotta, S., Cailleteau, L., Battaglia, S., Farlay, D., Dacquin, R., Barois, N., Jurdic, P., Boivin, G., Heymann, D., Lafont, F., Lu, S. S., Dempster, D. W., … Pierrefite-Carle, V. (2014). Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *Autophagy*, *10*(11), 1965–1977. https://doi.org/10.4161/auto.36182
- Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W., & Milz, S. (2004). Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer research*, *24*(6), 3743–3748
- Ponzetti, M., & Rucci, N. (2021). Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *International journal of molecular sciences*, *22*(13), 6651. https://doi.org/10.3390/ijms22136651
- Qin, C., D'Souza, R., & Feng, J. Q. (2007). Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *Journal of dental research*, *86*(12), 1134–1141. https://doi.org/10.1177/154405910708601202
- Riedel, R., Pérez-Amodio, S., Cabo-Zabala, L., Velasco-Ortega, E., Maymó, J., Gil, J., Monsalve-Guil, L., Ortiz-Garcia, I., Pérez-Pérez, A., Sánchez-Margalet, V., & Jiménez-Guerra, A. (2024). Influence of the Surface Topography of Titanium Dental Implants on the Behavior of Human Amniotic Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(13), 7416. https://doi.org/10.3390/ijms25137416

- Rosset, E. M., & Bradshaw, A. D. (2016). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, *52-54*, 78–87. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.02.001
- Sánchez-Labrador, L., Bazal-Bonelli, S., Pérez-González, F., Beca-Campoy, T., Cobo-Vázquez, C. M., Cortés-Bretón Brinkmann, J., & Martínez-González, J. M. (2025). Clinical Performance of Subperiosteal Implants in the Full-Arch Rehabilitation of Severely Resorbed Edentulous Jaws: A Systematic Review and Metanalysis. *Dentistry Journal*, *13*(6), 240. https://doi.org/10.3390/dj13060240
- Sekaran, S., Vimalraj, S., & Thangavelu, L. (2021). The Physiological and Pathological Role of Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase beyond Mineralization. *Biomolecules*, *11*(11),1564https://doi.org/10.3390/biom11111564
- Selvaraj, V., Sekaran, S., Dhanasekaran, A., & Warrier, S. (2024). Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization. *Differentiation; research in biological diversity*, *136*, 100757. https://doi.org/10.1016/j.diff.2024.100757
- Silva, R. C. S., Agrelli, A., Andrade, A. N., Mendes-Marques, C. L., Arruda, I. R. S., Santos, L. R. L., Vasconcelos, N. F., & Machado, G. (2022). Titanium Dental Implants: An Overview of Applied Nanobiotechnology to Improve Biocompatibility and Prevent Infections. *Materials (Basel, Switzerland)*, *15*(9), 3150. https://doi.org/10.3390/ma15093150
- Twine, N. A., Chen, L., Pang, C. N., Wilkins, M. R., & Kassem, M. (2014). Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone*, *67*, 23-32. 10.1016/j.bone.2014.06.027
- Vimalraj S. (2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, *754*, 144855. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855
- Ye, L., MacDougall, M., Zhang, S., Xie, Y., Zhang, J., Li, Z., Lu, Y., Mishina, Y., & Feng, J. Q. (2004). Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *The Journal of biological chemistry*, *279*(18), 19141–19148. https://doi.org/10.1074/jbc.M400490200

- Zhang, LaiChang & Chen, Liangyu. (2019). A Review on Biomedical Titanium Alloys: Recent Progress and Prospect. *Advanced Engineering Materials. 21(4)*. https://doi.org/10.1002/adem.201801215
- Zhang, S., Wan, H., Wang, P., Liu, M., Li, G., Zhang, C., & Sun, Y. (2018). Extracellular matrix protein DMP1 suppresses osteogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *501*(4), 968–973. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.092
- Zhu, Y. S., Gu, Y., Jiang, C., & Chen, L. (2020). Osteonectin regulates the extracellular matrix mineralization of osteoblasts through P38 signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, *235*(3), 2220–2231. https://doi.org/10.1002/jcp.29131
- https://www.atlanteistologia.unito.it/
- https://digitalhistology.org/
- https://www.dottoramoroso.it/denti-fissi-3/