

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
2. PARTE GENERALE	5
2.1 Tessuto osseo: struttura ed ultrastruttura	5
2.2 Ossificazione	10
2.2.1 Ossificazione diretta	11
2.2.2 Ossificazione indiretta	12
2.2.3 Processo di mineralizzazione	13
2.3 Impianti sottoperiosteali.....	15
2.4 Geni coinvolti nell'osteogenesi	19
3. MATERIALI E METODI	23
3.1 Colture cellulari	23
3.2 Saggio di proliferazione cellulare	23
3.3 Microscopia a fluorescenza	25
3.4 Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione	26
3.5 Real-time PCR.....	26
3.6 Analisi statistica	27
4. RISULTATI	28
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	41
6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	45

1. INTRODUZIONE

I materiali a base di titanio vengono utilizzati in modo promettente per la produzione di impianti, grazie al loro elevato rapporto resistenza/densità e al basso tasso di corrosione, soddisfacendo in tal modo la maggior parte degli aspetti fondamentali nello sviluppo di biomateriali metallici. Tuttavia, un impianto con un modulo elastico più elevato rispetto all'osso potrebbe portare a stress o ad un effetto schermante, favorendo così l'osteoporosi o provocando una scarsa osteointegrazione. Un manufatto con una quota di modulo elastico bassa agevolerebbe, al contrario, la crescita ossea (Kaseem et al., 2021).

L'adesione al tessuto osseo è necessaria per la sicurezza ed il successo a lungo termine degli impianti e il grado di formazione di nuovo osso attorno ad essi è considerato molto importante per la prognosi. Pertanto, sono stati ampiamente studiati diversi approcci di modificazione della superficie, come la mordenzatura, la sabbiatura e l'anodizzazione. In particolare, per superare gli inconvenienti sopra menzionati, molti gruppi di ricerca hanno suggerito l'ossidazione elettrolitica al plasma (PEO). È stato infatti riportato che il rivestimento poroso di ossido di titanio (TiO_2), realizzato su Ti e sue leghe tramite PEO in elettroliti acquosi, possiede proprietà meccaniche e capacità osteogenica accettabili. Inoltre, l'osteointegrazione dei materiali a base di Ti può essere significativamente migliorata ricoprendo le loro superfici con dei rivestimenti su scala nanometrica. Visto che la composizione e la struttura cristallina dell'idrossiapatite (HA) su scala nanometrica è simile a quella dell'osso umano, essa viene considerata un materiale promettente per le applicazioni in campo biomedico, grazie alla sua buona capacità di legarsi al tessuto osseo *in vivo* e alla sua stabilità chimica. È stato inoltre dimostrato che l'HA può promuovere l'angiogenesi, che a sua volta favorisce l'osteointegrazione. Per tale motivo ha suscitato un notevole interesse la formazione di HA endogena su scala nanometrica sulla superficie del TiO_2 prodotto tramite PEO,

insieme all'inclusione di elementi bioattivi in tali strati di ossido. I risultati degli studi *in vitro* hanno messo in evidenza come la PEO in una soluzione elettrolitica contenente Ca, P, Zn, Mg, Sr, Si e Mn stimolasse maggiormente la proliferazione degli osteoblasti sulla superficie dei campioni in lega di Ti rispetto al trattamento PEO in una soluzione contenente solo ioni Ca e P. Lo sviluppo di rivestimenti in TiO₂ contenenti Zn, Mg, Sr, Si e Mn rappresenterebbe quindi una strategia promettente volta al miglioramento dell'osteointegrazione dell'impianto, in virtù degli effetti combinati della struttura porosa dei rivestimenti ottenuti tramite PEO e di tali elementi (Kaseem et al. 2020; Sul et al., 2009).

Dal momento che l'atrofia ossea rappresenta una delle maggiori preoccupazioni in implantologia, recentemente diversi autori hanno suggerito un revival degli impianti sottoperiosteali. La produzione di tali manufatti è stata, però, rivalutata per quanto riguarda sia i materiali utilizzati che i fenomeni biologici coinvolti, con l'obiettivo di sviluppare dei dispositivi personalizzati che possano essere posizionati al di sotto del periostio in un'unica fase e siano in grado di stimolare la neoformazione di osso grazie alle proprietà osteogeniche della loro superficie (Strappa et al., 2022).

Pertanto, lo scopo di questo lavoro è stato, innanzitutto, quello di monitorare la proliferazione delle cellule MG63, una linea cellulare di osteosarcoma umano, dopo contatto diretto ed indiretto con cinque dischetti di titanio di grado 5 medicale sinterizzato (Figura 1), sottoposti ad un diverso trattamento superficiale (Tabella 1). Un sesto dischetto, la cui superficie non ha subito alcun trattamento, rappresentava il nostro controllo.

In seguito, nelle cellule MG63 esposte ai cinque dischetti trattati e a quello di controllo, è stata valutata l'espressione dei geni coinvolti nell'osteogenesi, per capire con quale

trattamento di superficie si ottiene una migliore integrazione dell'impianto con il tessuto osseo circostante.



Figura 1. Dischetti di titanio sinterizzato sottoposti a diversi trattamenti di superficie.

	TRATTAMENTO
Dischetto 1	Grezzo, decontaminato e pulito
Dischetto 2	Lucidato con elettroerosione
Dischetto 3	Mordenzato e sabbiato
Dischetto 4	Nuova superficie brevettata
Dischetto 5	Grezzo, pulito e anodizzato

Tabella 1. Trattamento della superficie dei diversi dischetti oggetto di studio in titanio di grado 5 medicale sinterizzato.

2. PARTE GENERALE

2.1 Tessuto osseo: struttura ed ultrastruttura

Il tessuto osseo è una particolare varietà di connettivo, costituito, quindi, da cellule e da sostanza intercellulare (o matrice). Si differenzia da tutti gli altri tessuti connettivi per il fatto che la sua matrice presenta un elevato grado di mineralizzazione (che aumenta con l'età), grazie al quale può svolgere le sue funzioni meccaniche e di protezione; non meno importante è inoltre il suo coinvolgimento nel ricambio minerale, dal momento che esso partecipa all'omeostasi del calcio. Esternamente l'osso è rivestito da una lamina di connettivo fibroso a fasci intrecciati strettamente aderente ad esso, il periostio, ad eccezione delle superfici articolari, a livello delle quali è ricoperto da cartilagine. Nel periostio si possono distinguere due strati: uno più superficiale, fibroso, relativamente povero di cellule, e uno più profondo, osteogenetico, ricco di capillari e di cellule. Il canale midollare, invece, è rivestito da una sottile lamina di tessuto connettivo, l'endostio, contenente cellule a varia potenzialità evolutiva. I costituenti organici ed inorganici del tessuto osseo sono così intimamente compenetrati che l'ablazione di uno di essi non comporta la perdita della forma del segmento scheletrico considerato: è possibile, infatti, demineralizzare l'osso con vari agenti chimici, oppure distruggere la componente organica mediante calcinazione ma la morfologia generale resta invariata.

La matrice extracellulare del tessuto osseo consta di una frazione organica e di una inorganica. La prima è formata da una componente fibrillare, costituita in prevalenza da fibre collagene, e da una componente amorfa, costituita da glicosaminoglicani e da glicoproteine associate al collagene. In aggiunta, nell'osso sono presenti delle glicoproteine esclusive, quali l'osteocalcina e l'osteonectina (entrambe prodotte dagli osteoblasti) e la sialoproteina. La frazione inorganica è invece responsabile delle proprietà

meccaniche e metaboliche del tessuto. Nel tessuto osseo è infatti immagazzinata una grande quantità di sali minerali, e ciò lo rende atto ad accumulare e/o cedere sostanze inorganiche, in modo da mantenere la loro concentrazione ematica costante, indipendentemente da variazioni di apporto alimentare o di escrezione. Tali minerali sono rappresentati in prevalenza da fosfati di calcio sotto forma di cristalli di idrossiapatite, da carbonato di calcio e da altri sali. Con il termine di matrice preossea o osteoide si intende quella parte di matrice interposta fra gli osteoblasti e quella già completamente mineralizzata; essa è costituita da sottili fibre collagene, non addensate e spesso non mineralizzate, separate da ampi spazi che contengono sostanza amorfa. Nella matrice mineralizzata sono scavate lacune, da cui si dipartono canalicoli più o meno ramificati ed anastomizzati; sono inoltre presenti altre cavità, più ampie, dove si trovano vasi, nervi e midollo osseo. A seconda della disposizione della matrice extracellulare a formare o meno lamelle, possiamo distinguere, dal punto di vista morfologico: un tessuto osseo non lamellare, filogeneticamente più antico, ed uno lamellare, maggiormente diffuso nella vita postnatale dei mammiferi. Il tessuto osseo lamellare, in particolare, deve le sue prestazioni meccaniche alla tendenza della matrice a disporsi in lamelle organizzate in modo da formare i sistemi osteonici, in cui le lamelle sono tra loro concentriche (tessuto osseo compatto), o da costituire trabecole che si intrecciano e anastomizzano e nelle quali le lamelle decorrono parallelamente tra loro (tessuto osseo spugnoso).

Le cellule che compongono il tessuto osseo sono: osteoblasti, osteociti, cellule di rivestimento ed osteoclasti. Gli osteoblasti sono cellule piuttosto voluminose che svolgono un'intensa attività osteogenetica in quanto producono la matrice organica e regolano la deposizione di quella inorganica. Esiste una correlazione diretta fra dimensioni e numero degli osteoblasti per unità di superficie e velocità di deposizione della matrice (che può essere valutata sfruttando la proprietà di alcune sostanze

fluorescenti di legarsi elettivamente alla matrice extracellulare in via di deposizione). Gli osteoblasti presentano un nucleo sferico od ovoidale spostato nella porzione di citoplasma opposta alla superficie di deposizione; nel citoplasma, intensamente basofilo e positivo alla reazione per la fosfatasi alcalina, sono presenti numerosi granuli di natura glicoproteica. Negli osteoblasti sono presenti inoltre numerosi mitocondri, un centriolo, microfilamenti, microtubuli e granuli di glicogeno. Man mano che l'attività di osteodeposizione si riduce, a livello citoplasmatico si ha un'attenuazione della basofilia e una riduzione del grado di sviluppo dell'apparato di Golgi e del numero di granuli PAS-positivi. Nella maggior parte dei casi gli osteoblasti rimangono murati nella matrice extracellulare da loro deposta e si trasformano in osteociti ma, in corrispondenza delle superfici rivolte verso il periostio e verso l'endostio, essi vanno a costituire le cellule di rivestimento. Per quanto concerne gli osteociti, nel tessuto osseo lamellare essi hanno forma ellissoidale e presentano prolungamenti citoplasmatici più o meno lunghi e ramificati. Il loro corpo cellulare ha sede in cavità della matrice denominate lacune ossee, dalle quali si dipartono esili canalicoli che contengono i loro prolungamenti, alle cui estremità sono presenti delle giunzioni comunicanti (*gap junction*), attraverso le quali gli osteociti possono effettuare scambi metabolici tra di loro e con il sistema circolatorio. In queste cellule la basofilia del citoplasma è appena rilevabile, l'apparato di Golgi è ridotto e i granuli PAS-positivi e la fosfatasi alcalina sono assenti. Le loro dimensioni dipendono direttamente da quelle degli osteoblasti da cui derivano. A differenza degli osteoblasti, gli osteociti non vanno incontro a mitosi, per cui l'aumento di spessore di un segmento osseo può realizzarsi solo per apposizione e non è mai di tipo interstiziale. Sulle superfici temporaneamente inattive del tessuto osseo troviamo invece le cellule di rivestimento, che sono fusiformi e fungono da mediatori degli scambi fra il sangue ed il liquido interstiziale che circola nelle lacune e nei canalicoli. Per quanto riguarda infine gli

osteoclasti, essi sono deputati alla degradazione di matrice ossea. Presentano dimensioni notevoli e, nella maggior parte dei casi, sono polinucleati. Il loro citoplasma risulta essere debolmente basofilo, o addirittura acidofilo, ed è positivo alle reazioni per la dimostrazione della fosfatasi acida. Gli osteoclasti sono localizzati sulle superfici ossee in via di riassorbimento, a cui aderiscono in risposta a segnali locali e sistemici. La loro morfologia varia in base al momento funzionale: quando sono liberi e mobili hanno forma indefinita per la presenza di pseudopodi lamellari; quando entrano in contatto con la superficie ossea retraggono gli pseudopodi e la membrana plasmatica presenta numerose invaginazioni, che rappresentano una riserva di membrana da utilizzare una volta attivati, quando subiscono profonde e rapide modificazioni, tra cui l'assunzione di una polarità ben definita. L'osteoclasto aderisce alla matrice ossea attraverso delle strutture specializzate denominate podosomi, che consistono in delle protrusioni coniche il cui asse centrale è costituito da fascetti di F-actina circondati da una guaina di vincolina, che a sua volta prende connessione con un'altra proteina detta talina. Nella porzione di citoplasma rivolta verso la superficie ossea sono concentrati i lisosomi, che riversano gli enzimi in sede extracellulare, dove si realizza la degradazione della matrice. L'attività osteoclastica, che porta all'osteolisi, si esplica in due fasi:

- demineralizzazione, dovuta all'abbassamento del pH a seguito del rilascio di ioni H^+ , che derivano dalla dissociazione dell'acido carbonico prodotto dall'anidrasi carbonica a partire da CO_2 e H_2O ;
- proteolisi della matrice demineralizzata, ad opera di idrolasi lisosomiali e metalloproteinasi (collagenasi).

Per comprendere l'omeostasi scheletrica e minerale, l'ossificazione e l'osteoporosi è importante conoscere il processo di differenziamento di osteoblasti, osteociti e osteoclasti. Le cellule osteoprogenitrici derivano da elementi mesenchimali, sono

localizzate nel periostio e nell'endostio e manifestano intensa attività mitotica. In rapporto alle esigenze locali o sistemiche esse possono rimanere quiescenti oppure differenziarsi in osteoblasti, da cui derivano gli osteociti e le cellule di rivestimento. Il paratormone, prodotto dalle paratiroidi, si lega ai recettori che si trovano sulla membrana plasmatica degli osteoblasti e li induce a produrre RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) e al contempo inibisce la secrezione di OPG (osteoprotegerina, che funge da falso recettore per RANKL competendo con il recettore RANK, presente sulla superficie degli osteoclasti), determinando così l'attivazione e il differenziamento degli osteoclasti, che derivano invece da una cellula midollare, progenitrice del monocita-macrofago (GM-CFU). L'equilibrio tra osteogenesi e osteolisi è quindi sotto il controllo degli osteoblasti, che regolano a loro volta l'attività degli osteoclasti, in risposta a stimoli ormonali. Dal canto loro, gli osteociti secernono fattori capaci di stimolare l'attività osteodepositrice degli osteoblasti, quali l'osteocalcina e l'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor-1). Essi, inoltre, sono in grado di riassorbire localmente lo ione calcio e di ritrasportarlo in circolo (Rosati et al., 2006).

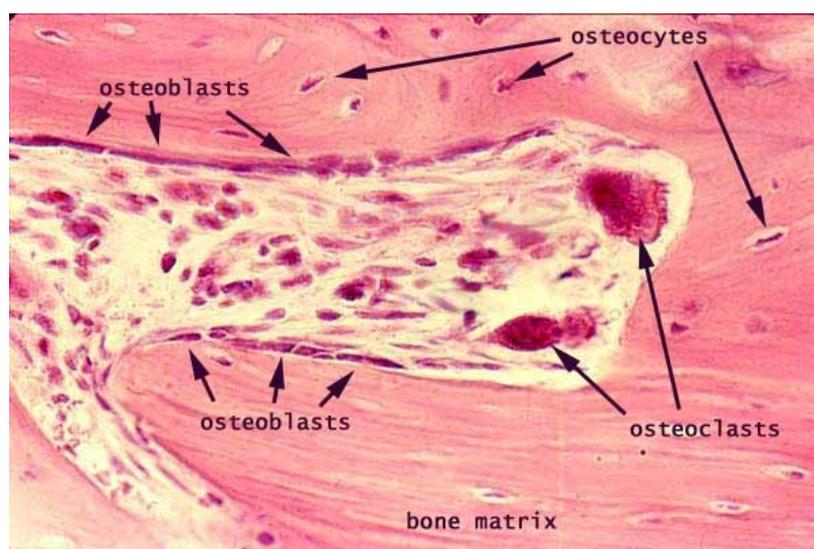


Figura 2. Sezione di tessuto osseo osservata al microscopio ottico: sono apprezzabili gli osteoblasti, gli osteoclasti, gli osteociti e la matrice ossea (<https://histology.siu.edu>).

2.2 Ossificazione

Nelle sedi dove si formerà il tessuto osseo si osservano inizialmente delle modificazioni del mesenchima, che consistono in una proliferazione delle cellule, cui segue un loro addensamento; si forma così un blastema (gruppo di cellule che rimangono a lungo indifferenziate e, proliferando, danno origine ad abbozzi di organi) che può ulteriormente evolvere secondo due linee:

1. un connettivo ricco di fibre e di vasi che andrà incontro a ossificazione diretta (o intramembranosa);
2. cartilagine ialina, che forma un abbozzo transitorio dei segmenti scheletrici interessati; in un secondo tempo la cartilagine viene distrutta e al suo posto si forma tessuto osseo (ossificazione indiretta).

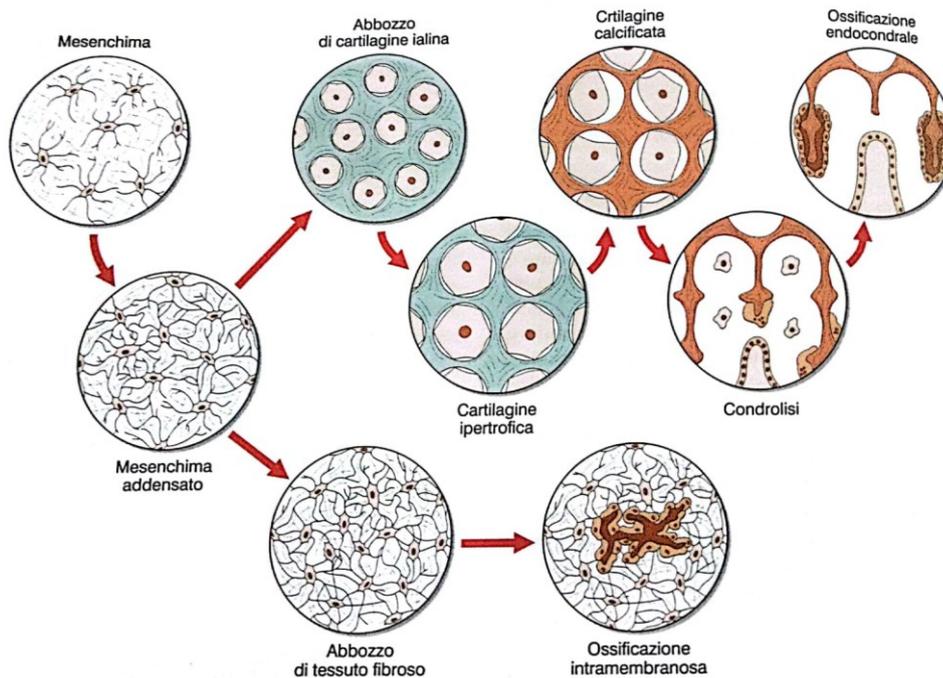


Figura 3. Schema che illustra le sequenze istogenetiche dell'ossificazione intramembranosa ed endocondrale (Rosati et al., 2006).

2.2.1 Ossificazione diretta

Tale tipo di ossificazione è tipica delle ossa piatte. Nel mesenchima si osserva inizialmente una neoformazione di vasi e si assiste ad un differenziamento delle cellule mesenchimali in cellule osteoprogenitrici, che a loro volta si differenziano in osteoblasti, che iniziano a produrre matrice. La matrice deposta da più osteoblasti confluisce, formando delle trabecole disposte irregolarmente, in cui ben presto si depositano i sali di calcio. Il tessuto osseo neoformato è a fibre intrecciate; esso verrà in seguito riassorbito e sostituito da tessuto osseo di tipo lamellare. A livello delle superfici in via di ossificazione il mesenchima si addensa, dando così origine al periostio. L'ossificazione mantellare, caratteristica della mandibola, è un tipo particolare di ossificazione intramembranosa che viene indotta dalla presenza di un abbozzo cartilagineo (cartilagine di Meckel) che funge da guida e in seguito viene riassorbito (Ross et al., 2010).

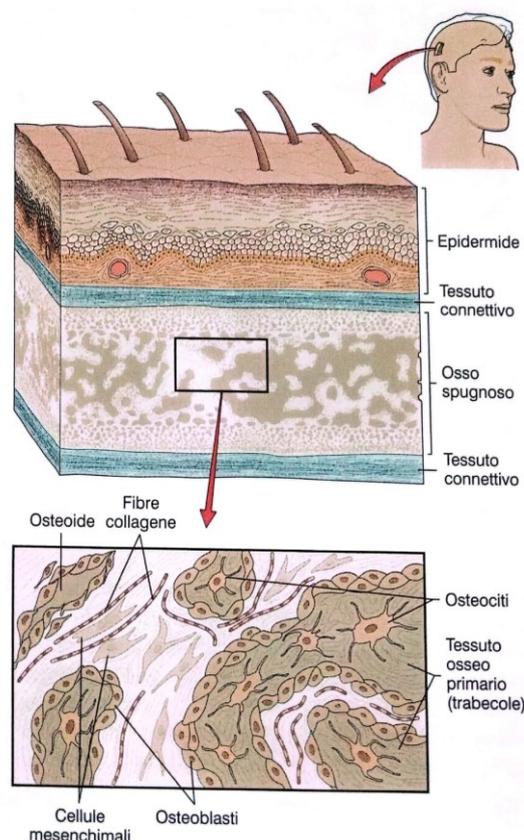


Figura 4. Illustrazione schematica dell'ossificazione intramembranosa (Rosati et al., 2006).

2.2.2 Ossificazione indiretta

Tale ossificazione è caratteristica delle ossa brevi e lunghe e si chiama indiretta perché l'osso sostituisce un modello cartilagineo preesistente. In essa possiamo distinguere due processi: un'ossificazione pericondrale, che ha luogo sulla superficie della cartilagine, e un'ossificazione endocondrale, che si svolge invece all'interno di essa (le ossa brevi presentano quasi esclusivamente un'ossificazione di questo tipo). Alla periferia degli abbozzi cartilaginei delle ossa lunghe si verifica inizialmente un'ossificazione intramembranosa a livello della parte profonda del pericondrio (ossificazione pericondrale). Parallelamente, i condrociti che si trovano al centro dell'abbozzo aumentano di dimensioni, mentre la matrice cartilaginea comincia a calcificare, isolando così i condrociti, che di conseguenza muoiono. Il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) prodotto dai condrociti ipertrofici promuove la neoformazione di vasi sanguigni, che si dirigono dal pericondrio (divenuto ormai periostio) verso la profondità del segmento cartilagineo; le cellule della loro parete si differenziano in condroclasti, che erodono la matrice cartilaginea calcificata, lasciando però dei sepiamenti, su cui gli osteoblasti provenienti dall'avventizia dei vasi depositano osteoide, che andrà in seguito incontro a mineralizzazione. Si forma così un tessuto osso non lamellare a fibre intrecciate, che sarà poi eroso e sostituito da osso lamellare. Attraverso distruzione e neodeposizione le ossa si rinnovano per tutta la vita, con ritmo ed estensioni variabili in relazione all'età. Ciò comporta mutamenti nell'architettura e nella struttura delle ossa. Questo processo, nel suo insieme, viene detto rimodellamento (Ross et al., 2010).

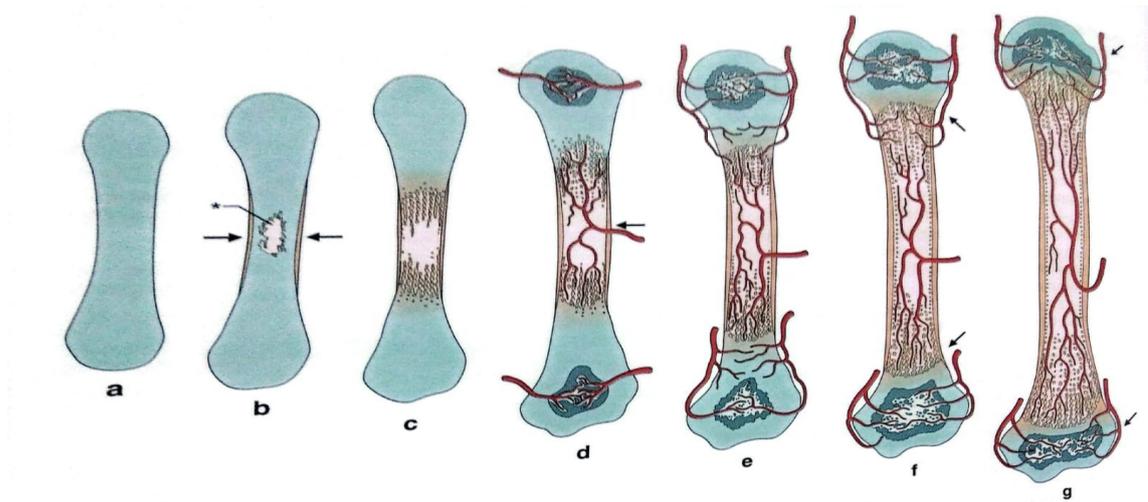


Figura 5. Schema che illustra le principali tappe dell'organogenesi delle ossa lunghe. I disegni, da sinistra verso destra, raffigurano: un abbozzo cartilagineo; un abbozzo nel quale sono da tempo comparsi i nuclei di ossificazione endocondrale e pericondrile della diafisi; un abbozzo con i nuclei di ossificazione endocondrale nelle epifisi; un osso lungo al termine dello sviluppo (Rosati et al., 2006).

2.2.3 Processo di mineralizzazione

La deposizione delle componenti organiche precede sempre la deposizione di sali (in forma amorfa o cristallina). Tale fenomeno viene spiegato dalla teoria della nucleazione, che presuppone la formazione di nuclei di cristallizzazione e la presenza di una sostanza nucleante; una volta formati i primi nuclei il processo progredirebbe per fenomeni esclusivamente fisici di accrescimento per apposizione. Non è facile individuare la sostanza o la struttura che induce il processo di nucleazione; per alcuni studiosi sono le fibre collagene a fungere da agenti innescanti. Per altri, invece, i primi cristalli di idrossiapatite si formano nelle vescicole di matrice (*matrix vesicle*), che conterrebbero l'agente nucleante; in queste vescicole si vedono dapprima delle granulazioni elettrondense e poi dei cristalli aghiformi, che si accrescono espandendosi fuori dalle *matrix vesicle*. Nella matrice mineralizzata sono presenti aggregati sferici di cristalli

aghiformi disposti radialmente, localizzati perlopiù tra le rare e sottili fibre collagene. Dopo demineralizzazione completa, nelle sedi dove erano presenti tali aggregati cristallini, è stata dimostrata la presenza di strutture filamentose diverse dalle fibre collagene, denominate filamenti assili, costituiti da proteine non collageniche con associata una componente polisaccaridica. *Matrix vesicle* e filamenti assili hanno un rapporto numerico inverso alla compattezza della matrice: essi, infatti, sono abbondanti nel tessuto osseo primario (a fibre intrecciate), mentre sono scarsi o difficilmente dimostrabili nel tessuto osseo compatto secondario.

Il processo di mineralizzazione della matrice, quindi, è:

- pilotato dagli osteoblasti, che depongono le componenti organiche della sostanza extracellulare, danno origine alle *matrix vesicle* e regolano il flusso degli ioni Ca^{2+} dai capillari alla matrice;
- realizzato nella matrice attraverso fenomeni complessi e in rapida successione: deposizione di sostanze inorganiche nelle *matrix vesicle*, diffusione di cristalli aghiformi nella matrice circostante e deposizione di minerali in rapporto alla bandeggiatura del collagene (che si ripropone ogni 64-70 nm). Quando le fibre sono poche e prevale la componente amorfa della matrice la calcificazione è rapida ed extra-fibrillare; viceversa è lenta ed intra-fibrillare quando il collagene è abbondante e strettamente aggregato (Rosati et al., 2006).

2.3 Impianti sottoperiosteali

L'atrofia ossea rappresenta una delle maggiori preoccupazioni in implantologia. Prima del posizionamento dell'impianto, si rendono infatti necessarie delle procedure rigenerative, i cui risultati non sono sempre prevedibili; oltre al rischio di complicanze intra- e post-operatorie, tali procedure richiedono tempi di attesa lunghi e determinano un aumento dei costi. Gli impianti sottoperiosteali possono essere considerati una valida alternativa alle complesse soluzioni rigenerative per la riabilitazione di gravi atrofie mascellari. Tali impianti sono stati introdotti a partire dagli anni '40 del secolo scorso. Tuttavia, è stata osservata la loro correlazione con un alto tasso di complicanze, come ad esempio infezioni ricorrenti, che hanno portato alla rimozione di molti dispositivi, fratture degli impianti stessi, riassorbimento dell'osso sottostante, parestesia e mobilità. La procedura, inoltre, era mal tollerata dai pazienti, perché richiedeva un intervento chirurgico in due tappe. Di conseguenza, gli impianti sottoperiosteali sono stati abbandonati a favore di quelli endosseali, che per il loro posizionamento necessitano però di una certa quantità e qualità di tessuto osseo. Per questo motivo, recentemente, diversi autori hanno suggerito un revival degli impianti sottoperiosteali, la cui produzione è stata però rivista alla luce delle moderne conoscenze nel campo della ricerca implantare, sia relativamente ai materiali che ai fenomeni biologici, con l'obiettivo di sviluppare dei dispositivi personalizzati che possano essere posizionati al di sotto del periostio in un'unica fase e siano in grado di stimolare la neoformazione di osso grazie alle proprietà osteogeniche della loro superficie, venendo così osteointegrati. Prima veniva impiegata una lega metallica a base di cobalto, cromo e molibdeno. Attualmente, il materiale utilizzato è la lega Ti6Al4V (titanio, alluminio, vanadio), che presenta delle caratteristiche meccaniche e biologiche migliori:

- riduzione del riassorbimento dell'osso sottostante;
- basso tasso di corrosione;
- bassa densità;
- eccellente biocompatibilità.

Studi istologici su modelli animali hanno dimostrato che questa lega permette la formazione di ponti di osteointegrazione tra la superficie implantare e il tessuto osseo sottostante, mentre in passato gli impianti sottoperiosteali andavano incontro a fibrointegrazione. Le caratteristiche della superficie degli impianti influenzano la loro capacità di stimolare la neoformazione di una quantità sufficiente di osso, che consente la stabilizzazione del dispositivo. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno, infatti, dimostrato un miglioramento dell'osteogenesi perimplantare se si utilizzano impianti con superfici rugose anziché lisce; esistono diversi metodi per modificare la rugosità superficiale di tali manufatti, come la sabbiatura e la mordenzatura. La parte rivolta verso i tessuti molli può venire invece lucidata, in modo da favorire l'adesione dei fibroblasti. Altri autori hanno, al contrario, messo in evidenza come l'utilizzo di superfici porose, ottenute mediante manifattura additiva, sia in grado di stimolare sia la crescita ossea che l'adesione dei tessuti molli. Negli studi *in vitro* viene generalmente utilizzata una linea cellulare di osteosarcoma, ovvero le cellule MG63, il cui differenziamento in senso osteogenetico è stato dimostrato essere dipendente dalla rugosità e dalla porosità della superficie dei materiali sui quali vengono coltivate. Si rendono, tuttavia, necessari ulteriori studi, allo scopo di comprendere quale sia il trattamento superficiale più adatto. La stabilità finale di tali impianti, che in passato si basava sulla ritenzione offerta dalle caratteristiche anatomiche dei mascellari e che era pertanto influenzata in modo significativo dall'accuratezza dei modelli ottenuti dalle impronte dirette delle ossa, non era comunque paragonabile, in termini sia qualitativi che quantitativi, a quella degli impianti endossei.

Gli impianti sottoperiosteici mostravano infatti una certa mobilità, che poteva portare ad un riassorbimento dell'osso circostante. Per cercare di ovviare a questo inconveniente, attualmente il design degli impianti per il mascellare superiore insiste non solo sui pilastri di resistenza medio-facciali (nasale e zigomatico) ma anche su quelli trasversali (palatini, in area mediana e paramediana). Tali pilastri di resistenza sono costituiti da osso corticale denso, che non va incontro a riassorbimento. Gli impianti vengono poi stabilizzati mediante fissazione rigida (con viti per osteosintesi), evitando così i micromovimenti tra impianto ed osso che potrebbero compromettere il risultato clinico. Gli impianti sottoperiosteici possono essere prima disegnati sul modello stereolitografico e poi scansionati per la successiva progettazione digitale, in modo da comprendere meglio le esigenze del caso clinico; altri autori, invece, hanno suggerito un flusso di lavoro completamente digitale. In precedenza, tali impianti venivano prodotti con la tecnica della fusione a cera persa: per prima cosa, si eseguiva il disegno del manufatto sul modello in gesso ottenuto dalle impronte prese direttamente sull'osso; l'impianto veniva poi modellato con la cera e infine veniva fuso in metallo. Le imprecisioni durante queste fasi potevano però pregiudicare l'adattamento finale degli impianti sull'osso e quindi il risultato clinico. Da qui l'opportunità di utilizzare i dati della tomografia computerizzata (TC) per realizzare un modello stereolitografico delle ossa mascellari, eliminando così anche l'esecuzione di un primo intervento chirurgico, necessario per ottenere un'impronta ossea diretta. Attualmente gli impianti sottoperiosteici vengono prodotti mediante manifattura additiva, attraverso sinterizzazione laser diretta del metallo (DMLS) o fusione laser selettiva (SLM), che consentono di ottenere, con un elevato grado di accuratezza, delle repliche tridimensionali di ciò che viene progettato digitalmente (Strappa et al., 2022; Cohen et al., 2016; Gittens et al., 2012).

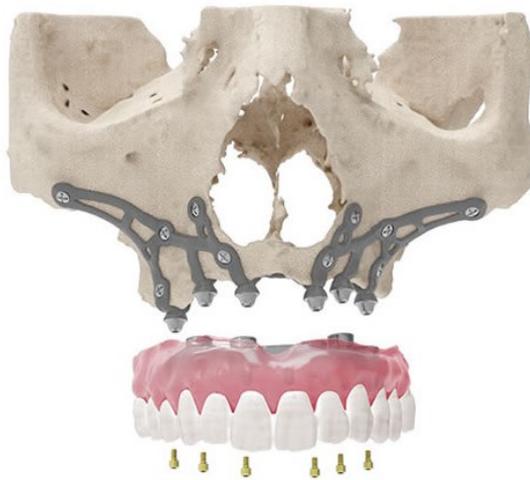


Figura 6. *Rappresentazione di un impianto sottoperiosteale di ultima generazione*
(<https://www.clinicheitaldent.com>).

2.4 Geni coinvolti nell'osteogenesi

L'osteointegrazione consiste nel collegamento strutturale e funzionale tra osso vivente e superficie di un impianto. Tale fenomeno vede il coinvolgimento di una serie di fattori, tra i quali la guarigione della ferita, la neoformazione di osso e il turnover tissutale. La deposizione di nuovo osso rappresenta la funzione più importante degli osteoblasti e avviene attraverso un processo strettamente regolato chiamato osteogenesi, nel quale numerosi fattori intrinseci ed estrinseci, tra cui ormoni e fattori di crescita, attivano proteine di segnalazione e fattori di trascrizione indispensabili per il differenziamento osteoblastico. Per valutare la neoformazione di tessuto osseo possiamo studiare diversi geni. Tra i primi ad essere coinvolti in questo processo ci sono quelli che codificano per molecole che fungono da segnale per i precursori osteo-condroblastici, come quelli codificanti per i fattori di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factors – FGF) e per il TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), citochina pro-infiammatoria multifunzionale che appartiene alla superfamiglia dei fattori di necrosi tumorale, e il PDGFA (Platelet-Derived Growth Factor subunit A), gene in posizione 7p22.3 costituito da 11 esoni, che codifica per un membro della famiglia proteica che comprende sia i fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF) che i fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), che svolgono un ruolo importante nella vasta gamma di processi di sviluppo. Nella formazione di nuovo tessuto osseo sono chiamati in causa anche diversi geni codificanti per le interleuchine, in particolare il gene di 4 esoni CSF3 (Colony Stimulating Factor 3), localizzato sul cromosoma 17 in posizione q21.1, che codifica per un membro della superfamiglia di citochine IL-6.

Durante il processo osteogenetico si assiste, inoltre, alla formazione di nuovi vasi sanguigni, che è regolata dall'espressione di geni che codificano per fattori di crescita come l'FGF in posizione 5q31.3, costituito da 12 esoni, e il VEGF; quest'ultimo consta

di 9 esoni, è in posizione 6p21.1 e, in particolare, viene prodotto dall'endotelio e dagli osteoblasti nelle fasi precoci della rigenerazione ossea stimolando la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali vascolari, che sono essenziali per l'angiogenesi. Vi sono poi altri geni che hanno un ruolo cruciale nello sviluppo osseo e nel mantenimento dell'omeostasi scheletrica, tra cui quelli codificanti per le proteine della superfamiglia del TGF- β (Transforming Growth Factor- β), come il TGF- β 1 che è composto da 7 esoni ed è localizzato sul cromosoma 19 in posizione q13.2, noto per indurre nelle cellule osteoprogenitrici la sintesi delle proteine morfogenetiche ossee (Bone Morphogenetic Proteins-BMP), che sono codificate dai rispettivi geni BMP e hanno dei potenti effetti osteogenetici (ad eccezione della proteina BMP3); il gene BMP2 costituito da 3 esoni e situato sul cromosoma 20 in posizione p12.3, in particolare, codifica per un ligando che lega vari recettori del TGF- β , portando così all'attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia SMAD (Small Mother Against Decapentaplegic), che trasducono il segnale dal citoplasma al nucleo, mediando molteplici percorsi di segnalazione. Il TGF- β 1, inoltre, recluta i precursori osteoblastici, stimola il loro differenziamento ed induce la produzione di osteoide e la sintesi dell'enzima fosfatasi alcalina (ALP). In aggiunta, esso rappresenta un importante fattore di accoppiamento tra gli osteoblasti e gli osteoclasti: da un lato favorisce infatti il reclutamento dei precursori ematopoietici degli osteoclasti, mentre dall'altro stimola la produzione di osteoprotegerina da parte degli osteoblasti, inibendo così il riassorbimento osseo osteoclasto-mediato. Ulteriori geni coinvolti nell'osteogenesi sono quelli codificanti per i fattori di trascrizione, come il gene RUNX2 (Runt-Related Transcription Factor 2) in posizione 6p21.1 e costituito da 10 esoni, che è considerato l'interruttore chiave del differenziamento osteoblastico; esso, infatti, codifica per la proteina omonima, che possiede diversi domini attivi in grado di attivare o reprimere geni di fondamentale importanza nel processo. Uno dei domini di transattivazione, ad esempio,

attiva i promotori dell'osteocalcina e del collagene di tipo I (codificato dal gene COL1A1 composto da 51 esoni che si trova in posizione 17q21.33) e la sua inattivazione determina l'inibizione della neoformazione di tessuto osseo. Molti altri fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione del differenziamento degli osteoblasti esercitano la loro funzione interagendo con RUNX2. Tra i geni che codificano per i fattori di crescita, quelli codificanti per l'IGF-1 (localizzato sul cromosoma 12 in posizione q23.2, costituito da 7 esoni) e l'IGF-2 (localizzato sul cromosoma 11 in posizione p15.5, costituito da 9 esoni) svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'equilibrio tra deposizione e riassorbimento dell'osso. L'IGF-1 interviene, nello specifico, nelle prime fasi dell'osteogenesi, promuovendo la proliferazione cellulare e la formazione della matrice ossea da parte degli osteoblasti differenziati, mentre l'IGF-2, che è più abbondante nel tessuto osseo ma meno potente dell'IGF-1, è coinvolto negli stadi tardivi del processo osteogenetico e stimola, in particolare, la produzione di collagene di tipo I, la sintesi della matrice cartilaginea e la proliferazione cellulare. Infine, tra i geni che vengono studiati per valutare l'osteogenesi, ci sono quelli codificanti per delle proteine che intervengono nel processo di mineralizzazione ossea, come il gene PHEX (Phosphate Regulating Endopeptidase X-Linked) composto da 26 esoni e situato sul cromosoma X in posizione p22.11, che codifica per un'endopeptidasi transmembrana, o il gene ALPL (Alkaline Phosphatase, Biomineralization Associated) in posizione 1p36.12 costituito da 14 esoni, che codifica per un enzima transmembrana glicosilato che fa parte della famiglia di proteine della fosfatasi alcalina. (Orlando et al., 2013; Hadjiargyrou et al., 2002; Li et al., 2007; Chau et al., 2009; Vimalraj et al., 2015; Lieberman et al., 2002; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>; <https://www.genecards.org/>).

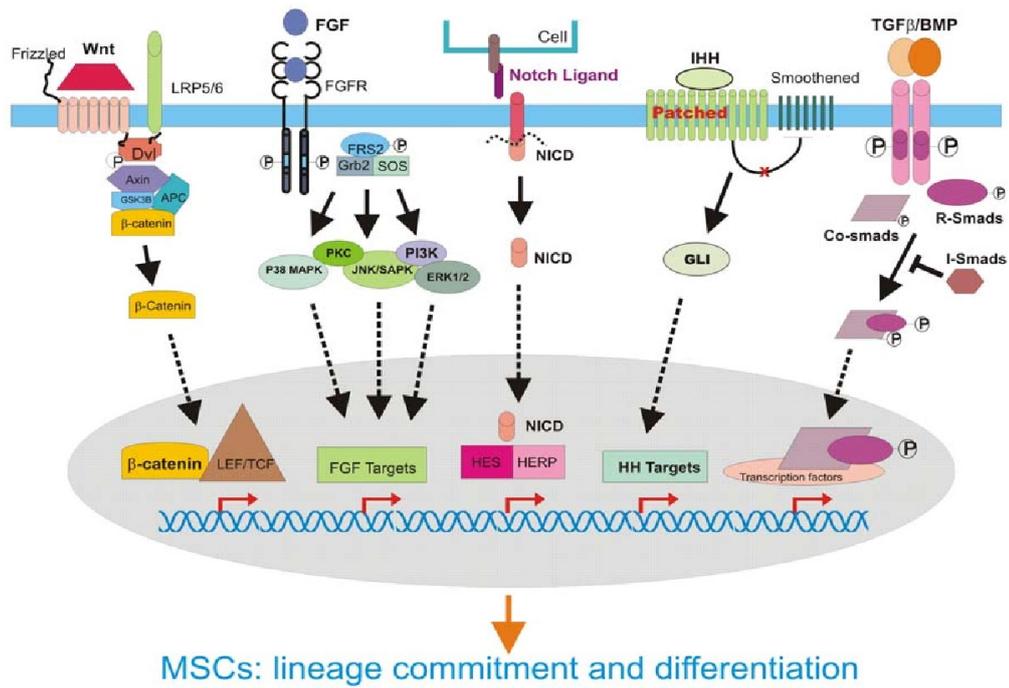


Figura 7. Illustrazione schematica delle vie di regolazione del differenziamento osteogenico. (Deng et al., 2008).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Per questo studio *in vitro* è stata utilizzata la linea cellulare di osteosarcoma umano MG63 (ATCC, Rockville, MD, USA), che rappresenta un modello cellulare ben consolidato. Le cellule sono state coltivate e mantenute in monostrato in fiasche di coltura T25 cm² in High Glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM High Glucose, Euroclone, Milano, Italia), supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS) e con penicillina/streptomicina 1X (Euroclone, Milano, Italia), e sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

3.2 Saggio di proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è stata valutata attraverso il test colorimetrico con bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a intervalli di tempo consecutivi o fissi, in presenza di dischi di materiale per impianti sottoperiosteali sottoposti a diversi trattamenti di superficie o dischi di controllo (superficie non trattata). I dischi ci sono stati forniti dalla Eaglegrid S.r.l. (Bergamo, Italia), azienda che lavora nell'implantologia customizzata sottoperiosteale. La proliferazione cellulare è stata valutata sia in seguito al contatto diretto delle cellule con i dischi che dopo aver posizionato questi ultimi nelle transwells (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) e aver consentito in tal modo il passaggio del terreno di coltura tra la camera superiore e la camera inferiore che conteneva le cellule.

Nel caso del contatto diretto, 3×10^4 cellule sono state seminate sui dischi in piastre da 24 pozzetti e sono state lasciate aderire ad essi per 5 ore nell'incubatore. Successivamente, il terreno è stato sostituito con 700 µl di DMEM High Glucose fresco. Per ogni timepoint,

la proliferazione cellulare è stata analizzata misurando la conversione del sale di tetrazolio, MTT, in cristalli di formazano. Nello specifico, 58,3 μl di reagente MTT (5 mg/ml in soluzione salina tamponata con fosfato) sono stati sciolti in terreno fresco completo (700 μl /pozzetto) e aggiunti a ciascun pozzetto. Dopo un'incubazione per 2 ore a 37°C, la soluzione è stata rimossa e 200 μl di 2-propanolo sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e trasferiti in una piastra a 96 pozzetti per la misurazione dell'assorbanza.

Per quanto riguarda invece il contatto indiretto, 3×10^4 cellule (per il test MTT a timepoint consecutivi fino a 72 ore) o 2×10^4 cellule (per l'analisi a 96 ore) sono state seminate in piastre da 24 pozzetti con terreno di coltura completo e sono state lasciate aderire durante la notte. Il giorno dopo, i dischi sono stati posizionati nelle transwell con pori di 8 μm di diametro (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA), consentendo lo scambio di terreno tra la camera superiore e la camera inferiore contenente le cellule. 41,6 μl di reagente MTT (5 mg/ml in soluzione salina tamponata con fosfato) sono stati sciolti in terreno fresco completo (500 μl /pozzetto) e aggiunti a ciascun pozzetto.



Figura 8. Inserti (transwell) da 8 μm in PET compatibili con piastre da 24 pozzetti (https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/9560361/contents).

Dopo un'incubazione di 2 ore a 37°C, la soluzione è stata rimossa e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 500 µl di 2-propanolo. L'assorbanza a 540 nm è stata misurata utilizzando un lettore di piastre ELISA Synergy HTX (BioTek, Santa Clara, CA, USA). I risultati sono stati espressi come percentuale del controllo e presentati come valori medi \pm deviazione standard di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato.

3.3 Microscopia a fluorescenza

Per mostrare l'effettiva differenza di proliferazione indotta dai dischetti 1, 2, 3, 4, 5 rispetto al controllo (dischetto non trattato), e quindi per confermare i dati ottenuti attraverso il saggio MTT, 3×10^4 cellule sono state seminate sui dischetti in piastre da 24 pozzetti e sono state lasciate aderire ad essi per 5 ore nell'incubatore. Successivamente, il terreno è stato sostituito con 700 µl di DMEM High Glucose completo fresco. Dopo 72h di incubazione il terreno è stato rimosso ed è seguito un lavaggio con PBS 1X, prima di procedere con il fissaggio delle cellule sui dischetti mediante incubazione con formaldeide al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente. La formaldeide è stata quindi rimossa e sono seguiti 3 lavaggi con PBS 1X. Infine, i dischetti sono stati lasciati in 700 µl di PBS 1X nella piastra 24-well e conservati a 4°C fino alle successive fasi di colorazione e visualizzazione delle cellule adese ad essi.

Per la preparazione del materiale da osservare 100 µl di montante con il DAPI (Prodotti Gianni Srl, Milano, Italia) sono stati depositati su dei vetrini portaoggetto (Bio-Optica, Milano, Italia), sui quali sono stati adagiati i singoli dischetti, ponendo a contatto la superficie su cui le cellule hanno aderito con il mezzo di montaggio fluorescente. A seguito di un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, i vetrini sono stati osservati attraverso l'utilizzo di un microscopio invertito a fluorescenza confocale Nikon A1R (Nikon Corporation, Tokyo, Giappone) con un obiettivo 20X e le immagini sono

state acquisite mediante il software di imaging e analisi NIS-Element (version 5.21.00; Nikon).

3.4 Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione

I pellet delle MG63 (3×10^5 cellule) sono stati omogeneizzati e l'RNA totale è stato isolato mediante l'SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) seguendo le istruzioni del produttore. Dopo aver stimato la purezza e la quantità dell'RNA mediante nanodrop, 1 μ g di RNA totale è stato retrotrascritto con random primer in un volume totale di 25 μ l per 60 minuti a 37°C utilizzando il kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), seguendo le istruzioni del produttore, e il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C per le successive analisi.

3.5 Real-time PCR

Per la profilazione dell'espressione di 84 geni correlati con il differenziamento osteogenetico è stato utilizzato l'Human osteogenesis PCR array SBHS-026ZD, fornito da Qiagen (Germantown, MD, USA). Il cDNA è stato mescolato con il kit QuantiNova™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Germantown, MD, USA) e in ciascun pozzetto dell'array è stata caricata un'aliquota da 20 μ l. Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando il CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Boulder, CO, USA). Le condizioni utilizzate per l'amplificazione hanno previsto 1 ciclo di 2 min a 95°C seguito da 40 cicli di 5 s a 95°C e 10 s a 60°C.

I dati derivanti dal PCR array sono stati analizzati con il metodo $\Delta\Delta$ Ct. I geni caratterizzati da un valore di Ct > 35 sono stati considerati non rilevabili. Il gene codificante per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stato utilizzato quale gene housekeeping di riferimento per calcolare il valore del Δ Ct relativo a ciascun gene

di interesse. Il valore di $\Delta\Delta\text{Ct}$ per ciascun gene è stato ottenuto calcolando la differenza tra il ΔCt del campione e il ΔCt del controllo. Il fold-change rispetto al controllo per ciascun gene è stato calcolato con il metodo $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

3.6 Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Le differenze tra i gruppi sono state determinate mediante il test ANOVA one-way. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4. RISULTATI

Le cellule MG63 sono state seminate su supporti 24-well e sono state poste a contatto con ciascuno dei cinque dischetti con diverso trattamento di superficie, valutando la proliferazione cellulare tramite saggio MTT dopo 96h di esposizione. I nostri risultati hanno evidenziato come l'esposizione ai dischetti 1, 2 e 4 sia in grado di stimolare la proliferazione cellulare rispetto ai controlli in maniera statisticamente significativa. Nel dettaglio, dopo 96h di esposizione, a fronte di una proliferazione cellulare del controllo del $303,85\% \pm 20,82$ rispetto al proprio tempo 0, il dischetto 1 ha mostrato una proliferazione del $382,87\% \pm 21,13$ rispetto al proprio tempo 0, il dischetto 2 ha mostrato una proliferazione del $399,65\% \pm 19,12$ rispetto al proprio tempo 0, e il dischetto 4 ha mostrato una proliferazione del $388,11\% \pm 25,14$ rispetto al proprio tempo 0. I dischetti 3 e 5 non hanno evidenziato significative differenze di proliferazione rispetto ai controlli (Figura 9).

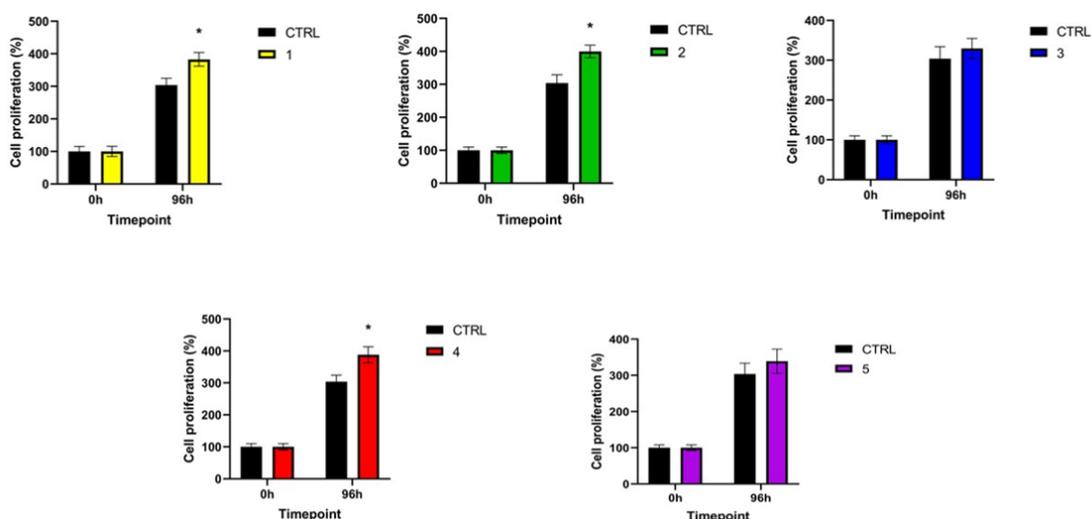


Figura 9. SAGGIO MTT. I grafici mostrano la proliferazione cellulare (media \pm deviazione standard) dopo 96h di incubazione con i diversi dischetti.

Successivamente abbiamo monitorato la proliferazione cellulare mediante il contatto indiretto delle cellule MG63 esposte ai dischetti 1, 2, 3, 4 e 5 analizzando i timepoints 0, 24, 48 e 72h.

In linea con i risultati ottenuti e precedentemente esposti, l'esposizione al dischetto 1 ha indotto un'aumentata proliferazione cellulare rispetto al controllo per i timepoints 48h e 72h. In particolare, a fronte di una proliferazione del controllo a 48h del $187,97\% \pm 15,47$, le cellule esposte al dischetto 1 hanno mostrato una proliferazione del $224,89\% \pm 20,39$, mentre a 72h il controllo ha mostrato una proliferazione del $213,75\% \pm 21,57$, inferiore a quella rilevata nelle cellule esposte al dischetto 1 pari al $285,06\% \pm 29,37$ (Figura 10).

Sorprendentemente, la proliferazione delle cellule esposte al dischetto 2 per i timepoints 0, 24, 48 e 72h è risultata diminuita rispetto a quella delle cellule di controllo, tendenzialmente per tutti i timepoints analizzati, ma in maniera statisticamente significativa esclusivamente per il timepoint a 48h. Nel dettaglio, a fronte di una proliferazione del controllo a 48h del $273,76\% \pm 25,51$, le cellule esposte al dischetto 2 hanno mostrato una proliferazione cellulare pari al $157,10\% \pm 18,32$. Tuttavia, vi è una tendenza a ridurre il *gap* di proliferazione al timepoint 72h, evento che, combinato con i risultati del timepoint a 96h, indicherebbe una sostanziale ripresa dell'attività proliferativa delle cellule.

Analizzando il dischetto 3, le cellule hanno mostrato un aumento importante della proliferazione cellulare statisticamente significativo a 72h di esposizione. Nello specifico, il controllo ha mostrato una proliferazione del $284,98\% \pm 29,31$ a 72h, nettamente inferiore a quella mostrata dalle cellule esposte al dischetto 3, pari al $383,47\% \pm 37,86$ (Figura 10).

Sempre coerentemente ai risultati ottenuti con l'esposizione delle cellule al timepoint fisso di 96h, l'esposizione al dischetto 4 ha indotto una differenza statisticamente

significativa nella proliferazione cellulare rispetto al controllo, a partire dal timepoint 48h e proseguendo con il timepoint a 72h. Nel dettaglio, a fronte di una proliferazione cellulare del controllo a 48h del $230,55\% \pm 17,18$, il dischetto 4 ha mostrato una proliferazione del $331,91\% \pm 29,13$, mentre a 72h il controllo ha mostrato una proliferazione pari al $263,34\% \pm 29,11$ nettamente inferiore a quella mostrata dalle cellule in presenza del dischetto 4, pari al $354,61\% \pm 31,20$ (Figura 10).

Inaspettatamente, la proliferazione mediante contatto indiretto delle cellule MG63 con il dischetto 5 risulta significativamente diminuita per il timepoint 72h. In particolare, il controllo ha mostrato una proliferazione del $271,64\% \pm 30,27$ a 72h, significativamente superiore a quella mostrata dalle cellule esposte al dischetto 5, pari al $210,35\% \pm 24,37$ (Figura 10). Tuttavia, considerando il timepoint a 96h, il tasso di proliferazione sembrerebbe riprendere vigore.

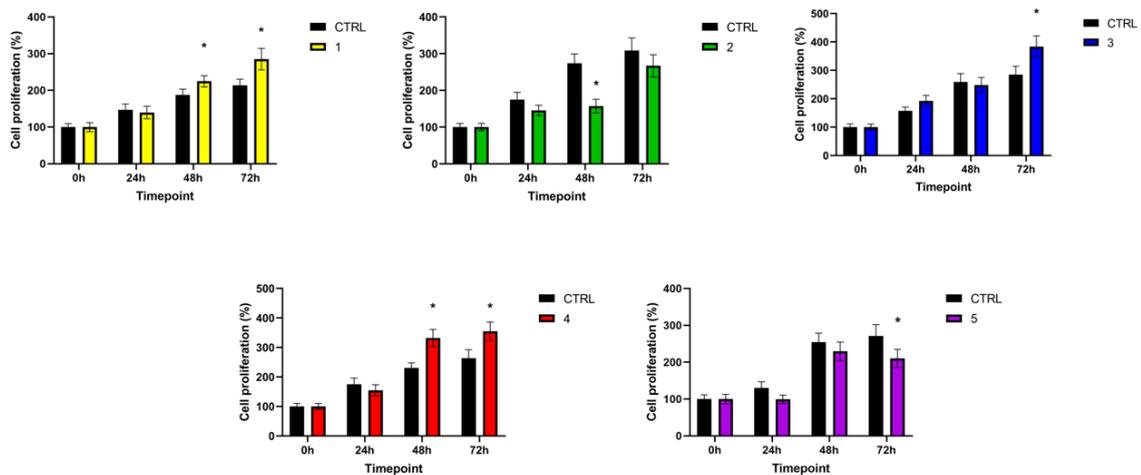


Figura 10. SAGGIO MTT. I grafici rappresentano la proliferazione cellulare (media \pm deviazione standard) per i timepoints 0, 24, 48 e 72h delle cellule MG63 incubate mediante contatto indiretto con i dischetti 1, 2, 3, 4, 5.

Infine, abbiamo valutato la proliferazione cellulare delle cellule MG63 attraverso il contatto diretto con i dischetti 1, 2, 3, 4 e 5 analizzando i timepoints 0, 24, 48 e 72h.

Il contatto con il dischetto 1, in linea con i risultati precedentemente ottenuti, ha indotto una proliferazione cellulare maggiore rispetto al controllo per i timepoints 48h e 72h. In particolare, a fronte di una proliferazione del controllo a 48h del $131,78\% \pm 19,62$, le cellule esposte al dischetto 1 hanno mostrato una proliferazione del $169,29\% \pm 19,67$, mentre a 72h il controllo ha mostrato una proliferazione del $164,81\% \pm 16,51$, inferiore a quella rilevata nelle cellule esposte al dischetto 1 pari al $250,92\% \pm 27,51$ (Figura 11).

Il *rate* di proliferazione delle cellule esposte al dischetto 2 per i timepoints 0, 24, 48 e 72h è coerente con quello ottenuto tramite il contatto indiretto delle cellule MG63 con il dischetto, risultando diminuita rispetto a quella delle cellule di controllo per i timepoints 24 e 72h, ma in maniera statisticamente significativa esclusivamente per il timepoint a 72h. Nel dettaglio, a fronte di una proliferazione del controllo a 72h del $164,81\% \pm 16,51$, le cellule esposte al dischetto 2 hanno mostrato una proliferazione cellulare pari al $130,40\% \pm 15,51$. Sebbene la differenza non sia significativa, al timepoint 48h abbiamo osservato un concreto recupero della proliferazione delle cellule a contatto con il dischetto 2 rispetto al controllo (Figura 11).

Soprendentemente, nel caso del dischetto 3, le cellule hanno mostrato un aumento importante della proliferazione cellulare statisticamente significativo tendenzialmente per tutti i timepoints di esposizione. Nello specifico, a fronte di una proliferazione cellulare del controllo a 24h del $90,84\% \pm 10,74$, il dischetto 3 ha mostrato una proliferazione del $249,00\% \pm 29,61$. Tale differenza di proliferazione, pur restando significativa, tende a ridursi a 48h, riprendendo ad aumentare a 72h, validando il risultato ottenuto nel caso della esposizione al dischetto al singolo timepoint a 96h. Nel dettaglio a 72h il controllo

ha mostrato una proliferazione del $164,81\% \pm 16,51$, nettamente inferiore a quella mostrata dalle cellule esposte al dischetto 3, pari al $380,08\% \pm 40,27$ (Figura 11).

In linea con i risultati ottenuti con l'esposizione delle cellule al timepoint fisso di 96h e con il contatto indiretto ai vari timepoints (0h, 24h, 48h e 72h), il dischetto 4 ha mostrato una differenza statisticamente significativa nella proliferazione cellulare rispetto al controllo, a partire dal timepoint 48h e proseguendo con il timepoint a 72h. Nel dettaglio, a fronte di una proliferazione cellulare del controllo a 48h del $131,78\% \pm 19,62$, il dischetto 4 ha mostrato una proliferazione del $203,61\% \pm 23,12$, mentre a 72h il controllo ha mostrato una proliferazione pari al $164,81\% \pm 16,51$ decisamente inferiore a quella mostrata dalle cellule in presenza del dischetto 4, pari al $231,17\% \pm 24,74$. (Figura 11).

Analogamente ai dati ottenuti attraverso il contatto indiretto delle cellule MG63 con il dischetto 5, anche con il contatto diretto c'è una riduzione significativa della proliferazione per il timepoint delle 72h. Nello specifico, a fronte di una proliferazione del controllo a 72h del $164,81\% \pm 16,51$, le cellule esposte al dischetto 5 hanno mostrato una proliferazione cellulare significativamente ridotta pari al $114,20\% \pm 16,38$ (Figura 11).

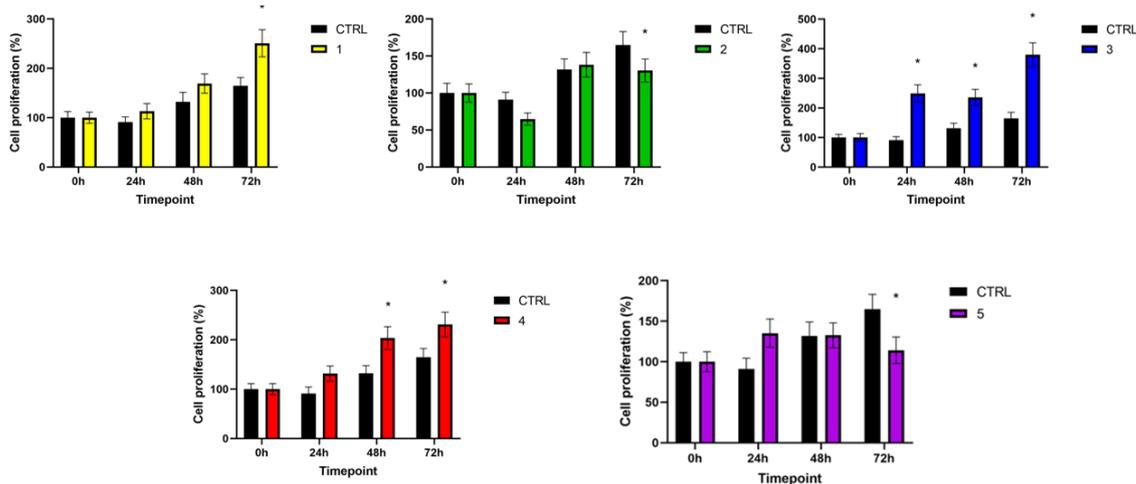


Figura 11. SAGGIO MTT. I grafici rappresentano la proliferazione cellulare (media \pm deviazione standard) delle cellule MG63 incubate mediante contatto diretto con i dischetti 1, 2, 3, 4 e 5, per i timepoints 0, 24, 48 e 72h.

La microscopia a fluorescenza ha permesso di verificare l'effettiva adesione e la differente proliferazione delle cellule MG63 incubate per 72h con i vari dischetti con diverso trattamento di superficie o con dischetto di controllo.

In linea con i dati ottenuti mediante il saggio MTT, la microscopia di fluorescenza ha dimostrato come il contatto diretto con i dischetti 1, 3 e 4 determini una maggior presenza di nuclei a 72h. Infatti, tale risultato è indicativo di una maggiore proliferazione cellulare rispetto alle cellule esposte al dischetto di controllo in quanto le cellule MG63 sono mononucleate, e di conseguenza ad ogni singolo nucleo corrisponde una singola cellula. Sempre coerentemente con i risultati del saggio di proliferazione, anche con la microscopia a fluorescenza una minore densità cellulare è riscontrabile nei dischetti 2 e 5 rispetto al dischetto di controllo (Figura 12).

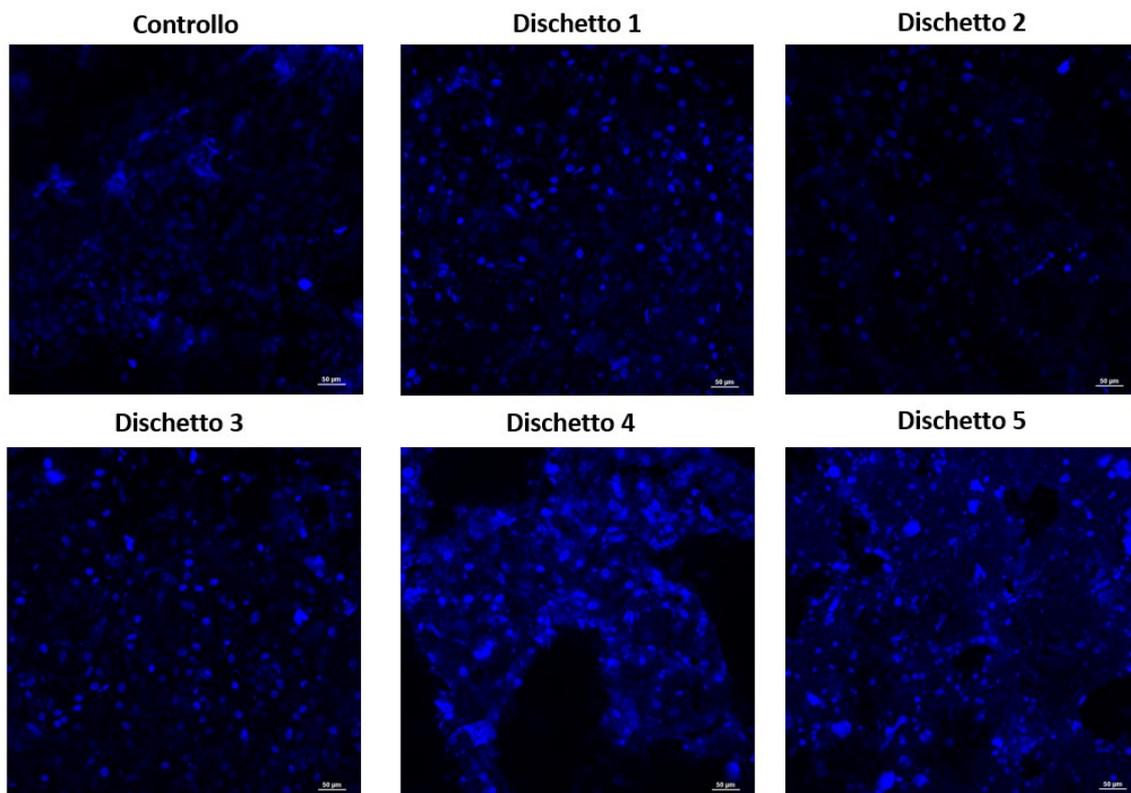


Figura 12. Immagini di microscopia a fluorescenza ottenute in seguito alla colorazione con DAPI dei nuclei delle cellule MG63 adese ai dischetti dopo 72h di incubazione con un obiettivo 20X. La scale bar impostata è di 50 µm.

Infine, nel presente studio sono state analizzate le variazioni nell'espressione di 84 geni coinvolti nell'osteogenesi a seguito dell'esposizione per 72h delle cellule MG63 al contatto diretto con i dischetti con trattamento di superficie innovativo rispetto al controllo. L'espressione di 39 geni è risultata significativamente aumentata rispetto al controllo. Considerando il fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) rispetto al controllo, l'espressione dei geni selezionati è riportata in Figura 13.

Analizzando i dati nel dettaglio, l'espressione di ALPL (Alkaline Phosphatase) rispetto al controllo è aumentata di 4,38 volte per il dischetto 3, di 2,11 volte nel dischetto 1, di 1,53 volte nel dischetto 4, di 1,97 volte nel dischetto 2 e di 1,25 nel dischetto 5. ANXA5 (Annexin A5) è incrementato di 9 volte nel dischetto 3, di 2,62 volte nel dischetto 1, di

2,12 volte nel dischetto 2, di 2,25 volte nel dischetto 4 e di 2,32 volte nel dischetto 5. BGN (Biglycan) è upregolato con un'espressione di 7,56 volte superiore al controllo per il dischetto 3, di 2,52 volte per il dischetto 1, di 2,38 volte per il dischetto 2, di 2,19 volte per il dischetto 4 e di 2,08 volte per il 5. Rispetto al controllo, l'espressione di BMP1 (Bone Morphogenetic Protein 1) è di 6,35 volte nel dischetto 3, di 3,00 volte nel dischetto 1, di 2,09 volte nel dischetto 2, di 2,24 volte nel dischetto 4 e di 1,63 volte nel dischetto 5; BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2) è upregolato di 11,17 volte nelle cellule a contatto con il dischetto 3, di 7,61 volte per dischetto 1, di 2,39 volte per il dischetto 2, di 4,26 per il dischetto 4 e di 2,31 volte per il dischetto 5; rispetto al controllo l'espressione di BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) è aumentata di 25,46 volte per il dischetto 3, di 7,67 volte per il dischetto 2, di 7,04 volte per il dischetto 4, di 7,17 volte per il dischetto 5; BMP6 (Bone Morphogenetic Protein 6) è incrementato di 6,99 volte nel dischetto 3, di 1,67 volte nel dischetto 2, di 4,03 volte nel dischetto 4 e di 1,28 volte nel dischetto 5 mentre non c'è differenza di espressione per questi ultimi due geni tra le cellule a contatto con il dischetto 1 e le cellule di controllo; l'espressione di BMPR2 (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2) è aumentata di 8,2 volte nel dischetto 3, di 2,95 volte nel dischetto 1, di 2,17 volte nelle cellule esposte al dischetto 2, di 2,33 volte nel dischetto 4 e di 2,14 volte nel dischetto 5. Per quanto riguarda il gene CD36 (CD36 molecole) non c'è differenza di espressione tra il controllo e le cellule a contatto con il dischetto 1, mentre è aumentato di 34,95 volte nel dischetto 3, di 4,82 volte nel dischetto 2, di 7,94 volte nel dischetto 4 e di 6,69 volte nel dischetto 5. CDH11 (Cadherin 11) è upregolato con un'espressione di 5,76 volte nel dischetto 3, di 3,22 nel dischetto 1, di 1,54 volte nel dischetto 2, di 2,07 nel dischetto 4 e di 1,67 nel dischetto 5. L'espressione di COL14A1 (Collagen type XIV alpha 1 chain) è tendenzialmente aumentata in tutti i dischetti: in particolare, è incrementata di 23,54 volte nelle cellule esposte al dischetto 3, di 3,53 volte

per il dischetto 1, di 3,39 per il dischetto 2, di 4,88 per il dischetto 4 e di 3,46 per il dischetto 5. COL3A1 (Collagen type III alpha 1 chain) è aumentato di 3,75 volte nel dischetto 3, di 1,14 volte nel dischetto 2, di 1,67 volte nel dischetto 4, mentre è downregolato, sempre rispetto al controllo, per il dischetto 1 con un'espressione di 0,77 e per il dischetto 5 con un'espressione di 0,84 volte. CSF1 (Colony Stimulating Factor 1) è sovraespresso con un'elevata differenza rispetto al controllo: in particolare CSF1 è incrementato di 51,72 volte nel dischetto 3, di 24,57 volte nel dischetto 1, di 13,39 volte nel dischetto 2, di 13,04 volte nel dischetto 4 e di 15,06 volte nel dischetto 5; anche l'espressione del gene CSF3 (Colony Stimulating Factor 3) è aumentata di 10,39 volte nelle cellule a contatto con il dischetto 3, di 46,00 volte nel dischetto 1, di 23,99 volte nel dischetto 4 e di 5,94 volte nel dischetto 5 mentre non c'è differenza di espressione per questo gene tra il dischetto 2 e il controllo. CTSK (Cathepsin K) è upregolato di 8,57 volte nel dischetto 3, di 9,56 volte nel dischetto 1, di 2,32 volte nel dischetto 2, di 3,13 nel dischetto 4 e di 2,34 nel dischetto 5. L'espressione di EGF (Epidermal Growth Factor) non è stata modificata nelle cellule esposte al dischetto 1, mentre per il dischetto 3 c'è stato un incremento di 5,73 volte, per il dischetto 2 di 1,63 volte, per il dischetto 4 di 2,12 volte e di 1,23 volte per il dischetto 5; EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) è sovraespresso di 4,72 volte nel dischetto 3, di 1,60 volte nel dischetto 1, di 1,20 volte nel dischetto 2, di 1,38 volte nel dischetto 4 e di 1,07 volte nel dischetto 5. L'espressione di FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) è aumentata di 8,17 volte nelle cellule incubate per 72h con il dischetto 3, di 5,03 volte con il dischetto 1, di 2,62 con il dischetto 2, di 2,46 volte con il dischetto 4 e di 2,43 con il dischetto 5. FN1 (Fibronectin 1) è incrementato di 11,26 volte nel dischetto 3, di 1,37 volte nel dischetto 1, di 3,18 volte nel dischetto 2, di 3,06 nel dischetto 4 e di 2,70 nel dischetto 5. L'espressione di GLI1 (GLI Family zinc finger 1) rispetto al controllo è aumentata di 7,41 volte nel dischetto 3, di

12,33 volte nel dischetto 1, di 2,09 volte nel dischetto 2 e di 2,00 volte nel dischetto 4 mentre non c'è differenza di espressione per questo gene tra il dischetto 5 e il controllo. ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) è sovraespresso di 7,48 volte nelle cellule esposte al dischetto 3, di 1,98 volte in quelle con il dischetto 1, di 1,88 volte in quelle con il dischetto 2, di 1,52 con il dischetto 4 e di 1,35 con il dischetto 5. IGF1R (Insulin like Growth Factor 1 Receptor) ha un'espressione maggiore rispetto al controllo di 8,31 volte con il dischetto 3, di 4,42 volte con il dischetto 1, di 2,48 volte con il dischetto 2, di 2,50 con il dischetto 4 e di 2,14 con il dischetto 5; IGF2 (Insulin like Growth Factor 2) dopo un'incubazione di 72h delle cellule con i vari dischetti è aumentato di 14,18 volte nel dischetto 3, di 1,32 volte nel dischetto 1, di 4,01 nel dischetto 2, di 3,48 nel dischetto 4 e di 3,05 volte nel dischetto 5. ITGA3 (Integrin subunit Alpha 3) è upregolato di 12,36 volte nel dischetto 1, di 4,66 volte nel dischetto 1, di 3,39 volte nel dischetto 2, di 4,29 volte nel dischetto 4 e di 3,53 volte nel dischetto 5; anche ITGB1 (Integrin subunit Beta 1) è espresso maggiormente nelle cellule esposte ai dischetti rispetto al controllo: in particolare l'espressione è incrementata di 6,95 volte nel dischetto 3, di 2,05 nel dischetto 1, di 2,04 nel dischetto 2, di 2,12 nel dischetto 4 e di 1,99 nel dischetto 5. L'espressione di MMP2 (Matrix Metalloproteinase 2) è aumentata di 21,23 volte nel dischetto 3, di 3,62 volte nel dischetto 1, di 4,14 volte nel dischetto 2, di 5,69 volte nel dischetto 4 e di 4,11 volte nel dischetto 5. NOG (Noggin) è upregolato di 44,30 volte nel dischetto 3, di 28,31 volte nel dischetto 1, di 4,14 volte nel dischetto 2, di 9,35 volte nel 4 e di 7,69 volte nel 5. Rispetto al controllo, RUNX2 (RUNX Family transcription factor 2) è sovraespresso di 3,77 volte nelle cellule incubate con il dischetto 3, di 13,75 volte con il dischetto 1, di 3,12 con il dischetto 2, di 6,59 con il dischetto 4 e di 4,20 con il dischetto 5. Il gene SERPINH1 (Serpin Family H member 1) è aumentato di 6,81 volte nel dischetto 3, di 4,34 nel dischetto 1, di 4,70 nel dischetto 2, di 8,32 nel dischetto 4 e di 5,26 nel dischetto

5; SMAD2 (SMAD Family member 2), sempre rispetto al controllo, è incrementato di 5,25 volte nel dischetto 3, di 1,18 volte nel dischetto 1, di 1,20 volte nel dischetto 2, di 1,65 volte nel dischetto 4 e di 1,68 nel dischetto 5; anche SMAD3 (SMAD Family member 3) ha un'espressione aumentata di 19,80 volte per il dischetto 3, di 4,45 volte per il dischetto 1, di 4,40 volte per il dischetto 2, di 6,72 per il dischetto 4 e di 5,27 volte per il dischetto 5. Il gene SOX9 (SRY-box transcription factor 9) è upregolato di 4,54 volte nel dischetto 3, di 4,02 volte nel dischetto 1, di 1,21 volte nel dischetto 2, di 1,29 volte nel dischetto 4 e di 1,12 volte nel dischetto 5. TGFB1 (Transforming Growth Factor Beta 1) è aumentato di 5,46 volte nel dischetto 3 e di 8,97 volte nel dischetto 4. Sempre per questo gene, non c'è differenza di espressione tra le cellule di controllo e le cellule incubate con il dischetto 1 mentre TGFB1 è downregolato nelle cellule esposte al dischetto 2 con un'espressione di 0,08 volte e al dischetto 5 con un'espressione di 0,20 volte; TGFBR1 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 1) è incrementato di 7,82 volte nel dischetto 3, di 3,04 volte nel dischetto 1, di 1,58 volte nel dischetto 2, di 2,82 volte nel dischetto 4 e di 2,04 volte nel dischetto 5; sempre rispetto al controllo, anche l'espressione di TGFBR2 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 2) è aumentata di 3,85 volte nelle cellule esposte al dischetto 3 e di 1,29 volte in quelle incubate con il dischetto 4, mentre è downregolato in tutti gli altri dischetti. TWIST1 (Twist Family bHLH transcription factor 1) è upregolato con un'espressione di 16,77 volte nel dischetto 3, di 8,54 nel dischetto 1, di 5,24 nel dischetto 4 e di 4,37 nel dischetto 5 mentre non c'è differenza di espressione tra le cellule di controllo e le cellule a contatto con il dischetto 2. VCAM1 (Vascular Cell Adhesion molecule 1) è sovraespresso di 71,78 volte nel dischetto 3 con una grande differenza rispetto al controllo, di 8,6 volte nel dischetto 2, di 13,14 volte nel dischetto 4 e di 9,82 volte nel dischetto 5 mentre non c'è differenza di espressione tra il controllo e le cellule incubate per 72h con il dischetto 1. VEGFA

(Vascular Endothelial Growth Factor A) è incrementato di 17,19 volte nelle cellule esposte al dischetto 3, di 4,16 volte con il dischetto 2, di 7,34 con il dischetto 4 e di 3,60 con il dischetto 5 senza alcuna differenza di espressione per quanto riguarda le cellule a contatto con il dischetto 1 rispetto al controllo; VEGFB (Vascular Endothelial Growth Factor B) sempre rispetto al controllo ha un'espressione aumentata di 12,75 volte per il dischetto 3, di 6,97 volte per il dischetto 1, di 2,44 volte per il dischetto 2, di 4,75 per il dischetto 4 e di 2,42 per il dischetto 5.

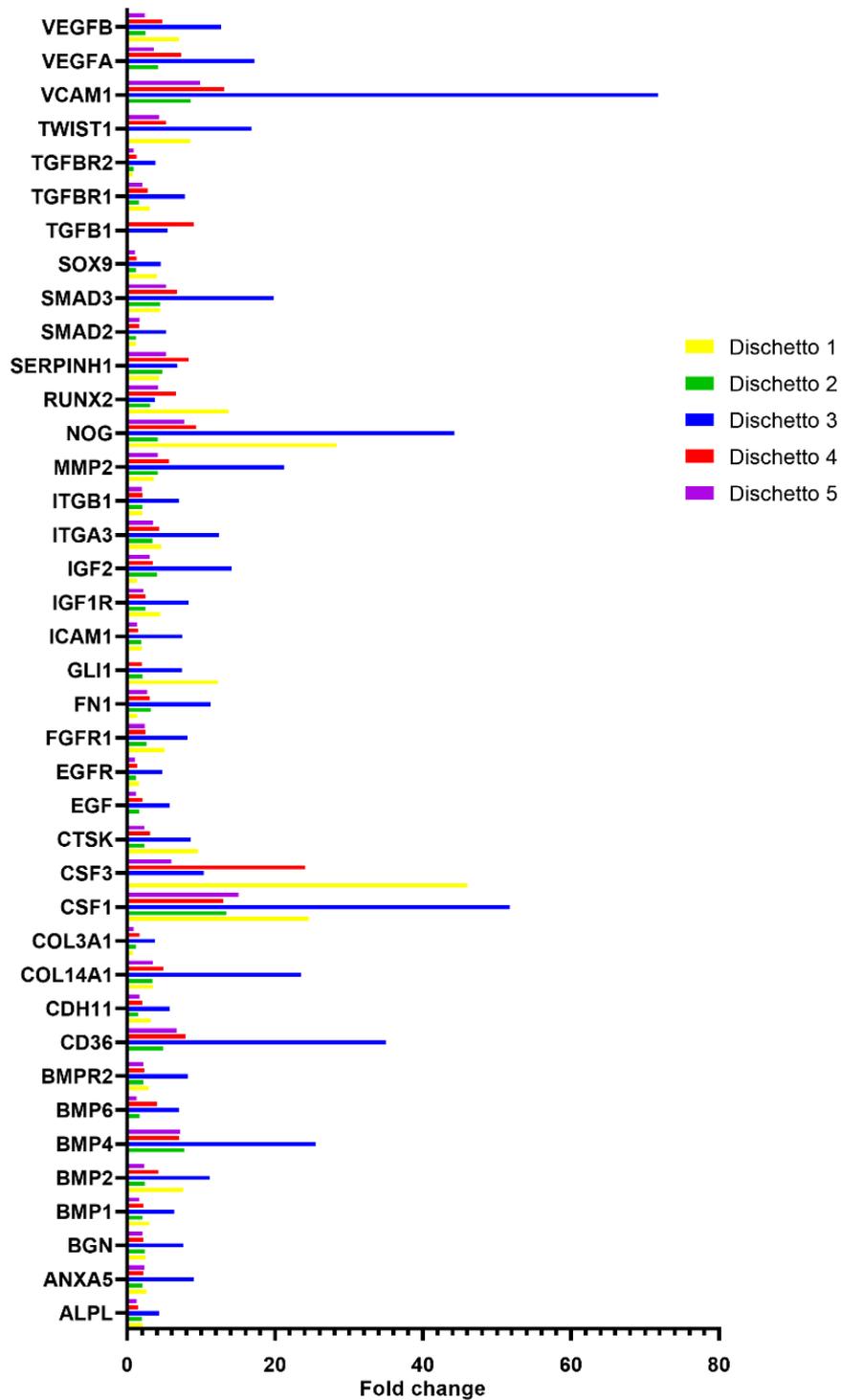


Figura 13. Espressione dei 39 geni selezionati. Nel grafico è riportato il fold change che mostra la differenza di espressione dei geni selezionati nelle cellule esposte ai diversi dischetti rispetto alle cellule di controllo.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo del presente studio sperimentale è stato quello di valutare la biocompatibilità di un materiale per impianti dentali sottoposto a cinque differenti trattamenti di superficie, focalizzandoci sull'effetto di tali trattamenti nei confronti della proliferazione cellulare e dell'espressione di geni coinvolti nel processo di osteogenesi, due caratteristiche fondamentali nell'ambito dell'integrazione del materiale per impianti dentali nel tessuto osseo umano.

I dati ottenuti hanno dimostrato chiaramente che in seguito all'esposizione delle cellule MG63 ai dischetti 1, 3 e 4 la proliferazione risulta significativamente aumentata rispetto alle stesse cellule esposte al materiale privo di trattamento di superficie. Di contro, i nostri risultati mostrano che il trattamento superficiale dei dischetti 2 e 5 esercita un effetto opposto, deprimendo la proliferazione cellulare. Questi risultati sono particolarmente importanti poiché tra i metodi attualmente in uso per migliorare l'osteointegrazione spicca la modulazione della guarigione tramite l'utilizzo di molecole bioattive quali i fattori di crescita, che hanno il compito di stimolare la proliferazione cellulare, e quindi la formazione di nuovo tessuto, il rimodellamento della matrice e l'angiogenesi. Per tali motivi, l'utilizzo di un materiale per impianti innovativo che possa impattare positivamente su tali processi risulta di particolare interesse nell'ambito della implantologia dentale.

Inoltre, l'utilizzo della microscopia a fluorescenza ha permesso di verificare ulteriormente come il trattamento a cui sono stati sottoposti i dischetti 1, 3 e 4 sia ben tollerato e come essi siano facilmente colonizzabili dalle cellule, favorendo quindi la loro potenziale applicazione nell'implantologia dentale. Di contro, i dischetti 2 e 5 sembrerebbero non costituire il materiale migliore, in quanto la loro colonizzazione da

parte delle cellule risulta difficoltosa, con risvolti negativi dal punto di vista della proliferazione cellulare.

Uno dei principali parametri che determina l'esito positivo di un intervento di implantologia dentale è correlato alla densità dell'osso neoformato intorno ai manufatti. Per tale motivo, il nostro studio sperimentale ha analizzato l'espressione differenziale di 84 geni coinvolti nell'osteogenesi, in cellule esposte per 72h ai dischetti costituiti da titanio sinterizzato sottoposto a diversi trattamenti superficiali rispetto al controllo. Tra i tanti analizzati, un totale di 39 geni è risultato essere espresso in maniera significativamente aumentata rispetto al controllo, e soprattutto nelle cellule esposte ai dischetti 1, 3 e 4: ALPL, ANXA5, BGN, BMP1, BMP2, BMP4, BMP6, BMPR2, CD36, CDH11, COL14A1, COL3A1, CSF1, CSF3, CTSK, EGF, EGFR, FGFR1, FN1, GLI1, ICAM1, IGF1R, IGF2, ITGA3, ITGB1, MMP2, NOG, RUNX2, SERPINH1, SMAD2, SMAD3, SOX9, TGFB1, TGFBR1, TGFBR2, TWIST1, VCAM1, VEGFA, VEGFB.

Tali geni sono coinvolti a vario titolo nella osteogenesi e nel rimodellamento o turnover osseo. In particolare, i geni COL14A1, COL3A1 e SERPINH1 sono correlati alla biosintesi del collagene, elemento fibroso abbondante e fondamentale per la matrice extracellulare dell'osso.

Anche i geni CD36, CDH11, FN1, ICAM1, ITGA3, ITGB1 e VCAM, codificanti per delle molecole di adesione, sono risultati upregolati maggiormente nelle cellule esposte al dischetto 3, sebbene la loro espressione sia risultata aumentata anche nelle cellule a contatto con gli altri dischetti oggetto di studio.

Anche altri geni coinvolti nell'osteogenesi, e in particolare implicati nella proliferazione cellulare, come ANXA5, BGN, BMP1, BMP2, BMP4, BMP6, EGF, EGFR, GLI1 sono risultati upregolati nelle cellule esposte ai vari dischetti, ma una particolare overespressione è stata rilevata per i dischetti 1 e 3, a conferma dei dati ottenuti con il

saggio di proliferazione e vitalità cellulare (MTT) e con l'analisi qualitativa effettuata al microscopio a fluorescenza.

Anche i geni RUNX2, TGFB1, TGFBR1, TGFBR2, SMAD2, SMAD3 e TWIST1, che sono normalmente coinvolti nello sviluppo osseo, poiché responsabili del differenziamento dei precursori osteoblastici e della produzione di osteoide, risultano overespressi nelle cellule MG63 dopo 72h di incubazione con i dischetti analizzati. La deposizione di nuovo osso che sembra essere indotta da tali trattamenti di superficie comporta anche una maggiore espressione di alcuni geni quali CSF1, CTSK, MMP2 e NOG coinvolti a vario titolo nel complesso processo di riassorbimento e rimodellamento osseo sotteso al normale turnover che è sempre presente nell'osso sano.

Non da ultimo, l'esposizione ai dischetti 1, 3 e 4 ha indotto una maggiore espressione di alcuni geni implicati nei processi di angiogenesi quali VEGFA, VEGFB e VCAM. Tale evidenza è particolarmente importante in quanto il VEGF, prodotto dagli osteoblasti nelle fasi precoci della rigenerazione ossea, svolge un ruolo chiave nella neoformazione di vasi e la sua espressione è essenziale nella morfogenesi scheletrica, partecipando alla formazione di nuovo tessuto osseo e al suo rimodellamento (Bambini et al., 2017; Chau et al., 2009; <https://www.genecards.org/>).

In conclusione, il nostro studio sperimentale *in vitro* ha messo in evidenza come l'esposizione delle cellule ai dischetti 1, 4 e soprattutto 3, caratterizzati da un differente trattamento superficiale, sia in grado di potenziare non solo la proliferazione cellulare ma anche l'espressione di geni chiave coinvolti nella rigenerazione e deposizione di nuovo tessuto osseo. Pertanto, l'utilizzo di tali trattamenti potrebbe rappresentare una strategia vincente nel campo della implantologia dentale. Sebbene tali dati dovranno essere validati da successive sperimentazioni *in vivo*, questo studio ha chiaramente dimostrato come questi particolari trattamenti superficiali siano in grado di favorire la deposizione di

nuovo tessuto osseo e quindi potenzialmente migliorare l'osteointegrazione degli impianti dentali.

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Bambini F., Santarelli A., Putignano A., Procaccini M., Orsini G., Memè L., Sartini D., Emanuelli M., Lo Muzio L. Use of supercharged cover screw as static magnetic field generator for bone healing, 1st part: in vitro enhancement of osteoblast-like cell differentiation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017 Jan-Mar;31(1):215-220.
- Chau JF, Leong WF, Li B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol* 2009;24:1593-606.
- Cohen DJ, Cheng A, Kahn A, Aviram M, Whitehead AJ, Hyzy SL, Clohessy RM, Boyan BD, Schwartz Z. Novel osteogenic Ti-6Al-4V device for restoration of dental function in patients with large bone deficiencies: design, development and implementation. *Sci Rep* 2016;6:20493.
- Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC, He TC. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* 2008;3:2001-21.
- Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD. Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces. *Biomaterials* 2012;33:8986–94.
- Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 2002;277:30177-82.

- Kaseem, M.; Fatimah, S.; Nashrah, N.; Ko, Y.G. Recent progress in surface modification of metals coated by plasma electrolytic oxidation: Principle, structure, and performance. *Prog. Mater. Sci.* 2020, 100735.
- Li X, Wang H, Touma E, Rousseau E, Quigg RJ, Ryaby JT. Genetic network and pathway analysis of differentially expressed proteins during critical cellular events in fracture repair. *J Cell Biochem* 2007;100:527-43.
- Lieberman JR, Dalulski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A: 1032-44.
- Mosab Kaseem, Han-Cheol Choe. Acceleration of Bone Formation and Adhesion Ability on Dental Implant Surface via Plasma Electrolytic Oxidation in a Solution Containing Bone Ions. *Metals* 2021, 11(1), 106.
- Orlando B, Giacomelli L, Ricci M, Barone A, Covani U. Leader genes in osteogenesis: a theoretical study. *Arch Oral Biol* 2013;58:42-9.
- Park, J.W.; Kim, H.K.; Kim, Y.J.; Jang, J.H.; Song, H.; Hanawa, T. Osteoblast response and osseointegration of a Ti-6Al-4V alloy implant incorporating strontium. *Acta Biomater.* 2010, 6, 2843–2851.
- Rosati P, Colombo R, Maraldi N. *Istologia*. Quinta edizione. Casa editrice Edi.Ermes, Milano, 2006.
- Ross Michael H, Pawlina Wojciech. *Istologia testo e atlante con elementi di biologia cellulare e molecolare*. Casa editrice ambrosiana, 2010.
- Strappa EM, Memè L, Cerea M, Roy M, Bambini F. Custom-made additively manufactured subperiosteal implant. *Minerva Dental and Oral Science* 2022;71:353-60.

- Sul, Y.T.; Kang, B.S.; Johansson, C.; Um, H.S.; Park, C.J.; Albrektsson, T. The roles of surface chemistry and topography in the strength and rate of osseointegration of titanium implants in bone. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2009, 89, 942–950.
- Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol* 2015;78:202-8.
- <https://histology.siu.edu>
- https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/9560361/contents
- <https://www.clinicheitaldent.com>
- <https://www.genecards.org/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>