



# **UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PARMA**

**Dottorato di ricerca in Malattie Osteometaboliche  
e Disordini del Metabolismo Idroelettrolitico e  
Acido-Base  
Ciclo XXIII**

**Un rivestimento dendrimerico innovativo  
per superfici implantari aumenta il  
differenziamento cellulare e stimola  
l'attivazione della via canonica di Wnt**

**Coordinatore**

**Chiar.mo Prof. Paolo Sansoni**

**Tutor**

**Chiar.mo Prof. Giovanni Passeri**

**Dottoranda**

**Dr.ssa Erida Elezi**

## INDICE GENERALE

### I INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

<b>1.0 I biomateriali</b> .....	5
1.1 La compatibilità di un biomateriale.....	6
<b>2.0 Biomateriali in Medicina</b> .....	7
2.1 Biomateriali in odontoiatria.....	9
2.2 Biomateriali in implantologia.....	11
<b>3.0 Trattamenti di superficie dei sistemi implantari</b> .....	13
3.1 Sandbasting/Sabbiatura Superficiale.....	15
3.2 Rivestimento in idrossiapatite degli impianti dentali.....	17
3.3 Titanio Plasma Spray.....	17
3.4 Rivestimento polimerico biomimetico.....	18
<b>4. Biomimetica</b> .....	18

### II MATERIALI E METODI

<b>1.0 Colture Cellulari</b> .....	23
1.1 C2C12.....	23
1.2 MC3T3.....	23
1.3 Cellule Stromali Midollari Murine.....	24
<b>2. Superfici implantari</b> .....	25

<b>3. Saggio di Proliferaazione Cellulare.....</b>	<b>27</b>
<b>4. Saggio Reporter.....</b>	<b>28</b>
<b>4. Espressione genica.....</b>	<b>29</b>
<b>5. Analisi Statistica.....</b>	<b>30</b>
<b>III I RISULTATI</b>	
<b>1. Proliferaazione Cellulare.....</b>	<b>35</b>
<b>2. Analisi Espressione Genica.....</b>	<b>36</b>

**IV DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

**V BIBLIOGRAFIA**

**-INTRODUZIONE-**

## 1.0 I Biomateriali

Lo sviluppo della moderna medicina è imprescindibile dal contemporaneo progresso tecnologico, che le mette a disposizione conoscenze, strumenti, materiali per poter raggiungere obiettivi di volta in volta più avanzati ed ambiziosi. Nell'ambito delle tecnologie biomediche lo studio dei *biomateriali* è divenuto uno dei capisaldi della ricerca, per le sue molteplici applicazioni e la vitale importanza che essi ricoprono nella fabbricazione di protesi o di dispositivi biomedici dalle svariate funzioni, sia di utilizzo interno che esterno all'organismo ospite. Il sostantivo biomateriale ha insito nella propria radice il suo significato che non è tuttavia privo di dubbi e deve essere pertanto chiarito. Nel 1974 il VI Simposio annuale internazionale sui Biomateriali li definiva come:

*“...sostanze sistematicamente e farmacologicamente inerti, designate per l'impianto all'interno di tessuti viventi o per l'incorporazione in essi.”* (Park, 1979). Successivamente nel novembre del 1982 durante la Consensus Development Conference on the Clinical Application of Biomaterials (Bethesda, USA) un gruppo di esperti elaborò la seguente definizione di biomateriale: *“Ogni sostanza o combinazione di sostanze, diversa da un farmaco, di origine sintetica o naturale, che può essere impiegata per qualsiasi periodo di tempo, da sola o come parte di un sistema che tratta, fa crescere o sostituisce un qualsiasi tessuto o organo del corpo”*. Definizione quest'ultima che pochi anni dopo in una seconda Consensus Development Conference nel 1986, stavolta a Chester,

---

venne modificata in una differente più coincisa definizione del termine biomateriale:

“...una sostanza non vivente, utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un’interfaccia con un tessuto vivente...” (1). Ne deriva per tanto la necessità di un contatto tra biomateriale e tessuto dell’organismo ricevente. Se deve essere presente un contatto, più o meno intimo, tra biomateriale ed organismo, la “convivenza” di questi è la base della sopravvivenza di qualsiasi protesi o manufatto . Questa capacità di coesistenza del biomateriale all’interno dell’organismo assume il nome di **compatibilità**, o **biocompatibilità**. Per compatibilità si intende genericamente la capacità di un oggetto, un manufatto, un materiale, di coesistere, coabitare, integrarsi con un tessuto, un organo, un sito ricevente in un organismo vivente. Un materiale è compatibile se, inserito in un tessuto ospite, non induce effetti avversi significativi e nemmeno ne subisce (Williams, 1982).

### **1.1 La compatibilità di un biomateriale**

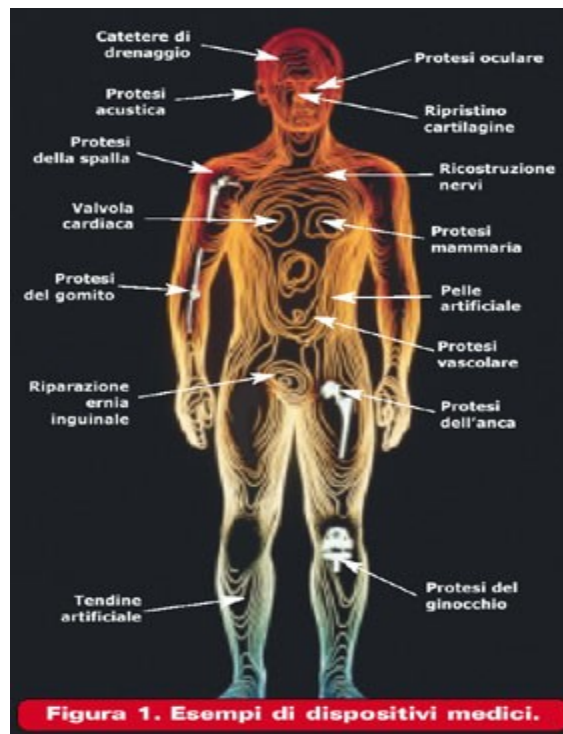
Il problema maggiore che s’incontra nella progettazione di un biomateriale è il dover far fronte alle diverse e severe condizioni a cui il materiale deve sottostare, in quanto deputato a sostituire funzioni molto complesse e delicate in un ambito molto complicato ed aggressivo quale il corpo umano. Infatti quando parliamo di compatibilità ci riferiamo ad una *compatibilità biologica (biocompatibilità)* intesa come l’attitudine del materiale a non determinare reazioni avverse nell’organismo, che di fronte ad ogni corpo estraneo impiantato in un tessuto reagisce riconoscendolo come “non-self”, con modalità aspecifiche e specifiche.(2)

*Compatibilità chimica*, con questo termine s'intende la proprietà del biomateriale di non subire, una volta collocato nel suo contesto biologico di utilizzo, processi chimici tali che ne rendano impossibile la funzione o ne vengano a far mancare la compatibilità biologica, vale a dire, processi chimici che determino la nascita di prodotti tossici per l'organismo; ed infine *compatibilità meccanica o fisica*, cioè l'idoneità del biomateriale a svolgere la funzione per la quale è utilizzato quindi presentare caratteristiche (quali durezza, modulo di elasticità ecc) simili al tessuto che va a sostituire in quanto deve fare fronte alle forze applicate nella sede d'impianto.(3)

## **2.0 I biomateriali in Medicina**

Fin dall'antichità, i medici hanno provato a sfruttare una vasta tipologia di materiali per il ripristino delle funzionalità organiche: gli Egiziani, i Greci e poi i Romani usavano spesso fibre vegetali e materiali di origine animale per suturare le ferite, oppure il legno come materiale di prima scelta per le prime protesi artificiali. L'uso dei metalli, invece, è molto più recente e risale alla guerra civile americana (1861-1865), quando si iniziò ad utilizzare delle viti metalliche per fissare i capi ossei di arti fratturati e lesi. Con l'inizio del Novecento, la medicina cominciò a sfruttare i nuovi materiali messi sul mercato dall'industria (come acciaio inossidabile, leghe metalliche, materiali plastici, ceramiche ecc), per quanto non progettati in modo specifico per scopi medicali. Con il crescere della domanda, però, la scienza ha cominciato a tenere conto anche dei complessi meccanismi che regolano le interazioni dei diversi materiali con i tessuti biologici: è così nata un'industria dedicata alla ricerca e alla produzione di biomateriali. I

biomateriali, quindi, sono frutto della collaborazione fra diverse discipline: chimica, medicina, farmacologia, biologia ed ingegneria, finalizzata alla realizzazione di nuovi dispositivi atti a ripristinare forme e funzioni dell'organismo umano. Gli studi sui biomateriali riflettono il costante bisogno dell'uomo di sostituire od integrare tessuti ed organi compromessi dal punto di vista funzionale, metabolico o danneggiati da eventi patologici o traumatici. Gli impieghi in medicina sono tra i più svariati e oggetto di costante ricerca per migliorarne le prestazioni.(figura 1)



Le sostituzioni articolari ad esempio richiedono particolari caratteristiche meccaniche; minor interferenza possibile nella trasmissione dei carichi, resistenza allo scorrimento plastico, basso coefficiente di attrito ad alta resistenza all'usura(4). I materiali utilizzati spaziano da polimeri sintetici biocompatibili



(figura.2) a materiali derivati del corallo, all'utilizzo di tessuti ossei naturali omologhi ed eterologhi fino ad arrivare alle più avanzate bioceramiche e compositi ceramico-polimero, con risultati clinici notevolmente migliorati sia in termini di durata che di biocompatibilità e funzionalità.

<b>Polimero</b>	<b>Sigla</b>	<b>Principali applicazioni</b>
Acido poliglicolico	PGA	Suture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari, placche di frattura degradabili
Acido polilattico	PLA	Placche e chiodi intramidollari, legamento artificiali, placche di frattura degradabili, somministrazione controllata di farmaci
Copolimeri Butadiene-Stirene	BS	Articoli monouso, imballaggi
Copolimeri Stirene-Acrilonitrile	SAN	Aspiratori per sangue, componenti di emodializzatori
Poliacrilonitrile	PAN	Membrane per emodialisi
Poliammidi		Suture
Policarbonato	PC	Membrane per ossigenatori ed emodialisi, linee ematiche
Polidrossietilmetacrilato	PHEMA	Lenti a contatto, legamenti artificiali
Polietilene	PE; LDPE	Film, imballaggi, cateteri, tubi connettori, somministrazione controllata di farmaci
Polietilene ( $\rho > 2000000$ )	UHMWPE	Superfici articolari, fibre per compositi, placche ortopediche, rivestimenti steli femorali
Polieterileneftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, suture, passaggi transcutanei, componenti di protesi valvolari, componenti di assistenza cardiaca
Polimetilmetacrilato	PMMA	Cemento osseo, lenti a contatto, lenti intraoculari, membrane per emodialisi, materiali dentari
Polipropilene	PP	Imballaggi sterili, siringhe, connettori, membrane per ossigenatori, fili di sutura, anse di supporto lenti intraoculari
Polisolfone		Membrane per ossigenatori ed emodialisi
Poltetrafluoroetilene	PTFE	Protesi vascolari, componenti di protesi valvolari, legamenti artificiali, rivestimenti
Poliuretani	PURs	Cateteri, cannule, tubi endotracheali, protesi valvolari, membrane per emodialisi, sacche ventricolari, rivestimenti emocompatibili, dispositivi di assistenza cardiaca, somministrazione controllata di farmaci, protesi vascolari
Polivinilcloruro	PVC	Sacche per sangue, tubi indotracheali, guanti monouso, cateteri, accessori monouso
Siliconi		Cateteri, drenaggi, membrane, pelle artificiale, impianti per chirurgia plastica, protesi vascolari, protesi tracheali, rivestimenti, infusori, componenti di protesi valvolari

Figura 2 Esempi dell'utilizzo dei polimeri nella costruzione di materiali biomedicali.

Patologie come stenosi o aneurismi rendono necessario l'inserimento di una protesi vascolare interna al vaso arterioso; altre come il bypass della creazione/sostituzione di un intero vaso e qualora non fosse possibile un auto innesto, di solito la vena safena, si ricorre alle protesi vascolari. Le protesi vascolari fabbricate con tessuto poliestere (Dacron, polietileneftalato) sono le più usate nella chirurgia vascolare periferica per la sostituzione di vasi di medio e

largo calibro e danno un follow-up di oltre 15-20 anni. La forma espansa del PTFE (Goretex, Impra, ecc) , ampiamente utilizzata come sostituto di arterie di medio calibro (fino a 6-7 mm), dimostra una bassissima incidenza di trombosi ed iperplasia.

## **2.1 I biomateriali in Odontoiatria**

Tra le varie branche della medicina l'odontoiatria e forse quella dove i biomateriali trovano largo uso e senza i quali questa branca non sarebbe in grado di ambire ai risultati che ogni giorno accertiamo con la clinica. Discipline come la conservativa, endodonzia (5, 6) dove il ripristino della forma e quindi funzione dell'elemento dentario si basa sulla sostituzione di tessuto lesionato con biomateriali come polimeri e materiali resinosi non esisterebbero in assenza di questi ultimi. Lo stesso si può dire in protesi dove i biomateriali come le varie leghe in protesi fissa e rimovibile e i polimeri in protesi mobile sono il fulcro delle riabilitazione della masticazione, fonetica ed estetica del paziente.

Il campo che però beneficia di più dei materiali biocompatibili è sicuramente quello parodontale ed implantare, con molteplici valenze: da un lato la costruzione di impianti ossei, cioè di strutture inserite nel contesto del tessuto osseo di selle edentule a sostituire denti precedentemente perduti, dall'altro la rigenerazione di tessuto parodontale perso per cause patologiche. Quest'ultima applicazione si pone in più ampio contesto di ricerca in quella che oggi viene definita tissue engineering, cioè rigenerazione tissutale guidata, una serie di tecnologie che consente di indurre o incrementare i fenomeni riparativi di ricostruzione di un tessuto danneggiato, attraverso l'impiego di membrane a permeabilità selettiva,

per la creazione di spazi privilegiati per la rigenerazione di ligamento parodontale o l'utilizzo di analoghi ossei con proprietà :

**osteoaduttive** quando abbiano la possibilità di indurre la neo formazione di tessuto osseo, anche in altri tessuti (fino ad oggi l'unico materiale di questo tipo è rappresentato dall'osso fresco, per la presenza della ormai celebre Proteina Ossea Morfogenetica, BMP)

**osteoaduttive** qualora inducano la formazione di tessuto osseo solo nel contesto di tessuto osseo preesistente, come l'idrossiapatite di sintesi o l'apatite naturale ottenuta attraverso deproteinizzazione dell'osso eterologo, cioè di origine di specie diverse dall'uomo.

## **2.2 I biomateriali in Implantologia**

L'obiettivo principale dell'odontoiatria moderna è quello di ripristinare al paziente il normale funzionamento, fonetica, salute ed estetica dell'apparato stomatognatico. In pazienti che presentano perdite di elementi dentari per traumi, problemi parodontali o endodontici gli impianti dentali rappresentano una delle soluzioni che più soddisfano questo obiettivo. In seguito a successi importanti a lungo termine l'implantologia ha preso sempre più piede nella riabilitazione del paziente parzialmente o totalmente edentulo. Si è stimato che il numero di impianti inseriti negli USA si è quadruplicato dal 1983 al 1987, con numero di operatori affacciatisi a tale tipo di terapia addirittura decuplicati. Crescita ponderale resasi evidente anche in Europa ed in Giappone, vista l'importanza dei problemi legati all'edentulismo. È il National Institute of Dental Research (NIDR) a fornire un quadro allarmante del periodo dal 1985 al 1986, in uno studio

condotto su americani adulti e su centri di accoglienza per anziani. Infatti, circa il 42% degli americani oltre i 65 anni d'età ed il 4% tra i 35 e i 64 anni sono totalmente edentuli. Quelli con più di 65 anni e denti propri, ne hanno persi una media compresa tra 10 e 28, mentre gli impiegati tra i 55 e i 65 anni si arrestano in un intervallo compreso tra 9 e 28. Se facciamo un salto veloce nella storia dell'implantologia per capire i concetti base che hanno portato alle conoscenze per il successo della terapia implantare non possiamo non menzionare gli anni '60, che videro l'esplosione degli impianti osteointegrati, in quel di Goteborg, ad opera di un ortopedico, Branemark (4). L'osteointegrazione rappresentava una connessione diretta tra l'osso e l'impianto, senza strati di tessuto molle interposti (5, 6). Data la povertà strumentale dell'epoca, che non consentiva un'indagine istologica accurata riguardo al grado di ancoraggio diretto all'osso, i primi criteri per valutare il successo implantare facevano perno sulla sua stabilità: un processo grazie al quale si ottiene, e si mantiene, nell'osso una fissazione rigida, asintomatica clinicamente, di materiale alloplastico durante il carico funzionale. Definizione questa sconcertante per un'ottica scientifica ancora scettica; l'impianto orale doveva inglobarsi solo nei tessuti molli, non garantendo la necessaria stabilità. Fu lo stesso Branemark, con i suoi esperimenti sull'integrazione ossea negli animali nel '52 e nel '65 su mandibola umana, a far vacillare questa torre di convinzioni (7, 8), mentre Schroeder l'abbatté definitivamente fornendo le prime microfotografie istologiche (9). Il termine *osteointegrazione* però fu usato per la prima volta da Albrektsson (1981) (10), che la definiva come una "Diretta connessione funzionale e strutturale tra osso vitale e la superficie di un impianto sottoposto a carico". Lo stesso autore elencò

una serie di fattori il cui controllo diventava essenziale per ottenere uno stato di osteointegrazione. Questi fattori coinvolgevano:

- 1) Biocompatibilità;
- 2) Disegno;
- 3) Caratteristiche della superficie dell'impianto;
- 4) Condizione del sito ricevente;
- 5) Tecnica chirurgica;
- 6) Condizioni di carico

Il titanio, materiale bioinerte, elemento puro a basso peso specifico, presente in natura sotto forma di minerali di titanio, utilizzato sia puro che sotto forma di leghe (6% di Al + 4% Va) rappresenta il materiale ideale per la progettazione e produzione dei sistemi implantari. L'alluminio migliora la durezza e riduce il peso specifico, migliorando il suo modulo di elasticità. Il tutto si traduce in una maggiore elasticità e più equa distribuzione del carico nelle zone di passaggio osso-impianto, minimizzando, assieme al vanadio, la conducibilità termica (circa il 50% in meno) ed aumentando dello stesso valore la resistenza all'usura e alla fatica. Durante la lavorazione del titanio, il contatto con l'aria porterà alla formazione di uno strato di ossido di titanio che, dallo spessore iniziale di 10Å, passerà a 50-100Å. Tali ossidi (TiO, TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>3</sub>) verranno ulteriormente incrementati dalla successiva sterilizzazione. Il tratto caratteristico degli ossidi è la passivazione delle strutture vicine, evitandone la corrosione ed incrementando la biocompatibilità del titanio stesso. (Lausmaa 1996; Eisenbarth et al. 2002; Sul 2003) Secondo normative internazionali ASTM (American Society for Testing

and Materials) e ISO (The International Organizzazione for Standardization) il titanio viene classificato come indicato nella Tabella 1.

Tabella 1. Classificazione del titanio

Forma	Lega	Normativa
I grado	Ti (0,15 Fe; 0,12 O <sub>2</sub> )	ASTM F 67 e ISO 5832-2
II grado	Ti (0,20 Fe; 0,18 O <sub>2</sub> )	ASTM F 67 e ISO 5832-2
III grado	Ti (0,25 Fe; 0,25 O <sub>2</sub> )	ASTM F 67 e ISO 5832-2
IV grado	Ti (0,30 Fe; 0,35 O <sub>2</sub> )	ASTM F 67 e ISO 5832-2
V grado	Ti (0,06 Al; 0,04 V)	ASTM F 136 e ISO 5832-3

### 3.0 Trattamenti di superficie dei sistemi implantari

Al fine di migliorare l'osteointegrazione, la ricerca si è indirizzata verso la comprensione delle interazioni dinamiche tra la superficie dei materiali e l'ambiente biologico in cui sono inseriti e particolare attenzione è stata posta sulla fabbricazione di dispositivi in grado di stimolare i tessuti biologici. E' ormai riconosciuto come le proprietà superficiali di un impianto influenzino l'interazione con il tessuto nel quale viene inserito e come materiali bioattivi incoraggiano la formazione di osso e il suo legame con l'impianto (Anselmeet al. 2000a, Mueller et al. 2002). La tessitura di superfici gioca un ruolo cruciale nelle interazioni biologiche tra tessuto e materiale per le seguenti ragioni principali: 1) la superficie del materiale è l'unica parte del biomateriale in diretto contatto con l'ambiente biologico 2) la regione superficiale del biomateriale è quasi sempre diversa in composizione e morfologia rispetto il corpo del materiale e 3) per i biomateriali che non presentano un rilascio di sostanze nell'ambiente la superficie

è quella che governa la risposta biologica dei tessuti in rapporto con il materiale. La modificazione della tessitura può portare quindi a miglioramenti nelle proprietà chimiche, fisiche e meccaniche aumentando così la resistenza alla corrosione, biocompatibilità, l'energia di superficie dei materiali, requisiti fondamentali per l'osteointegrazione e quindi del successo in implantologia (Schwartz & Boyan 1994).

Secondo alcuni autori questo comportamento diverso degli osteoblasti sulle topografie superficiali diverse sarebbe spiegabile attraverso una diversa energia di superficie del materiale rugoso rispetto a quello liscio, che determinerebbe un differente assorbimento di biomolecole specifiche di questo fenotipo cellulare dal siero al materiale impiantato (30).

I risultati *in vitro* hanno una controparte in diversi esperimenti *in vivo*. Numerose ricerche hanno dimostrato che impianti con superficie rugose vanno incontro ad una migliore osteointegrazione rispetto a materiali di pari composizione ma di tessitura superficiale liscia, che hanno la tendenza più elevata a esitare in una guarigione attraverso un incapsulamento fibroso (32, 33).

La produzione di manufatti implantari si è volta dunque a sperimentare tecniche atte a produrre una superficie rugosa che avesse caratteristiche ottimali per l'utilizzo clinico. Diverse sono state le vie seguite. Da un lato l'uso di **plasma spray**, vale a dire di particelle "spruzzate" contro la superficie di titanio, creando pertanto delle rilevatezze laddove si è depositata la particella. Questa è, per così dire, una metodica *per addizione di materiale*; al contrario più usate sono le tecniche che prevedono una *sottrazione* di titanio, sia per via meccanica, sia per via chimica (o combinate): cioè è possibile una **mordenzatura acida** (con HCl o

H<sub>2</sub>HSO<sub>4</sub>) oppure una sabbiatura (**sand blasting**) con allumina di diverse dimensioni e durezza, con biossido di silicio o biossido di titanio, che generano dei pozzetti, dei *pits* di geometria differente.

La diversa efficacia della geometria dei pits nel raggiungimento di una migliore stabilità implantare è stata indagata dal punto di vista matematico da Hansson e Norton (34), che hanno evidenziato la superiorità di pozzetti dalla morfologia tondeggiante (*half-spherical shape*) rispetto a quelli di sezione irregolare nella creazione di legami più tenaci col tessuto osseo a parità di dimensioni del pozzetto. La conformazione della rugosità e soprattutto la sua dimensione sembra avere però un'influenza non solo a livello meccanico di solidità dell'ancoraggio implantare, ma anche a livello cellulare, sulla adesione, proliferazione e maturazione della cellula, come diversi esperimenti *in vitro* suggeriscono in maniera inequivocabile (35,36).

#### *Sand-blasting /Sabbiatura superficiale*

La sabbiatura ha principalmente tre obiettivi: 1) la decontaminazione della superficie prima di qualsiasi ulteriore procedimento, 2) aumentare la rugosità in modo da aumentare la superficie di contatto biomateriale-tessuto e non solo, ma anche migliorare la risposta degli osteoblasti nella fase di guarigione post-chirurgica, ed infine 3) aumentare i benefici in termini di stress residuo da compressione. Dalla letteratura emerge che la rugosità (>10 µm) influenza le proprietà meccaniche dell'interfaccia, la maniera di distribuzione e trasmissione delle forze, l'intecossione meccanica e la biocompatibilità del biomateriale. In una scala minore la rugosità di superficie posta in un range 10nm -10 µm



influenza l'interfaccia biologica in quanto e dell'ordine delle dimensione delle cellule e grandi biomolecole. Infine le variazioni topografiche inferiori a 10nm possono influenzare l'adesione di biomolecole sulla superficie dell'impianto.

Tra gli agenti sabbianti più frequenti utilizzati abbiamo l'allumina ( $Al_2O_3$ ) con particelle di dimensioni sempre inferiori o il silicio ( $SiO_2$ ), anche se negli ultimi anni si stanno vedendo dei nuovi agenti per la sabbatura quali ossidi di titanio ( $TiO_2$ ) e ossido di zirconio ( $ZrO_2$ ) per evitare problemi di contaminazione da agenti sabbianti.

#### *Rivestimento in idrossiapatite degli impianti dentali.*

Il rivestimento di impianti con idrossiapatite ha suscitato un grande interesse per le sue proprietà di legame con l'osso. Alcuni autori hanno dimostrato che questo legame non induce fenomeni di tossicità o di natura flogistica (58)(de Groot et al. 1998; Barrere et al. 2002; (60, 61)Sena et al. 2002). Inoltre, l'interazione con il tessuto osseo si verifica in tempi inferiori rispetto ad impianti non trattati. Lo scarso legame però presente all'interfaccia fra idrossiapatite e titanio, ne ha ridotto l'impiego.

#### *Titanio Plasma Spray*

Il rivestimento di titanio, liscio o filettato con polveri di titanio è una delle varie tecniche per ottenere un incremento della rugosità superficiale. Si sfrutta un bruciatore al plasma ad arco voltaico, in grado di elevare la temperatura di un gas nobile o di  $N_2/H_2$  con immissione di polveri di idruro di titanio che, grazie alla fusione del loro strato più superficiale, aderiscono al corpo del sistema implantare.

Il plasma si produce tra un anodo di cromo ed un catodo di tungsteno raffreddato. Il risultato è un rivestimento poroso di spessore di circa 50m ed un incremento della superficie di legame disponibile di almeno dieci volte (Ungersbo"ck et al. 1996).

#### *Rivestimento polimerico biomimetico*

I dendrimeri sono polimeri ramificati che formano delle strutture 3D ben organizzate partendo da monomeri. La loro architettura può essere finemente disegnata cambiando la composizione dei loro monomeri, creando così polimeri con caratteristiche diverse fisico-chimiche e biologiche. La loro plasticità, quindi, le rende idonee ai bisogni della bio-ingegneria, in quanto possono fungere da substrato capace di dare un ancoraggio alle cellule, e come matrice artificiale per dare supporto alla matrice extracellulare (ECM) depositata dalle cellule stesse. La matrice extracellulare gioca un ruolo chiave nel definire il comportamento cellulare all'interno di un tessuto e in contatto con un biomateriale. L'ECM presenta dei gruppi funzionali ai quali le strutture di adesione cellulare possono legarsi, rende possibile il cambio di ossigeno e nutrienti tra cellule e vasi sanguigni, funge da riserva di fattori di crescita, che possono presentare quindi rilascio lento ed infine fornisce un supporto strutturale ai tessuti.

#### **Biomimetica**

La tradizionale definizione di biomateriale inteso come materiale "inerte" per la sostituzione di tessuti o parte di organi risulta oggi superata. Infatti, le attuali e future prospettive di ricerca sono ormai focalizzate sullo sviluppo di nuove generazioni di biomateriali. Così, dal primo concetto di sostituzione di

organo/tessuto (medicina riparativa) si è passati al concetto di medicina rigenerativa, dove lo sviluppo di materiali sintetici va verso la progettazione di “carrier” di cellule e/o farmaci, di “scaffold” per la riparazione in vitro o in vivo di tessuti e organi, alla realizzazione di materiali e superfici “biomimetici”, riconosciuti da parte dell'organismo come proprio, e di materiali “intelligenti”, sensibili a stimoli o a segnali biologici quali cambiamenti di temperatura, pH, o concentrazione di particolari biomolecole. La biomimetica nasce dallo studio della struttura e della funzione dei sistemi biologici come modello per il design e l'ingegnerizzazione dei materiali. I materiali biomimetici sono stati pensati in modo da mimare i sistemi biologici naturali con lo scopo di suscitare un'appropriata risposta cellulare per la rigenerazione dei tessuti.

Un approccio biomimetico nell'implantologia come vediamo viene rappresentato dai rivestimenti superficiali dei sistemi implantari. L'idea nasce dal tentativo di replicare i stimoli biochimici che guidano le funzioni degli osteoblasti, mimando le composizioni strutturali e biochimiche dei tessuti biologici.

Lo scopo di questo studio in vitro era quello di indagare il comportamento delle linee cellulari murine e cellule primarie stromali murine quando seminate su superfici di titanio diverse in presenza o assenza di rivestimenti innovativo dendrimerico di fosfo-serina/poli-lisina e osservare se quest'ultima può influenzare positivamente la risposta cellulare.

## **-MATERIALI E METODI-**

## **Colture Cellulari**

### **i)MC3T3-E1,**

Questa linea cellulare preosteoblastica murina, ottenuta da American Type Culture Collection (LGC Standards S.r.l., Sesto S.Giovanni, MI, Italy), è stata mantenuta in coltura in Dulbecco Modified MEM (DMEM, Euroclone) supplementata con 10% Siero Fetale Bovino (FBS, Euroclone), 1% Penicillina e Streptomina (Penstrep, Euroclone) e 1% L-Glutammina (Euroclone). Quando giunte ad una confluenza del 70% sono state staccate ed utilizzate per l'analisi dell'espressione genica. Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 100.000 cellule/pozzetto in piastre da 12 pozzetti (Euroclone), in triplicato. Dopo 24 ore dalla semina il terreno proliferativo viene cambiato con terreno differenziativo preparato aggiungendo Acido Ascorbico 250 mM (Sigma Chemicals, St. Louis MO, USA).

### **ii)C2C12**

Le cellule mioblastiche murine forniteci da European Catalog of Cell Cultures (Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, UK) sono state coltivate in D-MEM contenente 10% di Siero Fetale Bovino (FBS) e addizionato di antibiotici in incubatore a 37° C in atmosfera umidificata e con pressione parziale di CO<sub>2</sub> pari al 5%. Le cellule sono state seminate sulle placchette di titanio in OptiMEM (Invitrogen, San Giuliano Milanese, MI, Italia), 5% FBS, 1%

Penstrep ad una concentrazione di 100000 cellule/pozzetto per il saggio reporter ed analizzate a 24 ore dalla trasfezione.

### iii) Coltura Cellulare Primaria

In questa serie di esperimenti, inoltre, sono state utilizzate cellule midollari murine prelevate da topi di 2 mesi con background a prevalenza CD1 gentilmente concessi dall'istituto di Istologia, Università degli Studi di Reggio Emilia e Modena. I topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale (*figura.3 a-i*). I femori e le tibie sono state prelevate *a, b*, successivamente le estremità dei capi ossei sono stati rimossi *c, d* per permettere il flushing contenuto midollare. Il tutto dopo averlo raccolto in tubi separati viene centrifugato, filtrato, lavato e seminato ad una concentrazione di  $5 \times 10^6$  in piastre da 12 pozzetti. Le cellule sono state tenute in coltura in medium arricchito con acido ascorbico ed il terreno è stato cambiato per intero al giorno 3 e 8 di coltura mantenendo quindi solo le cellule adese. In fine al giorno 10 si è proceduto all'estrazione del mRNA per l'analisi dell'espressione genica .

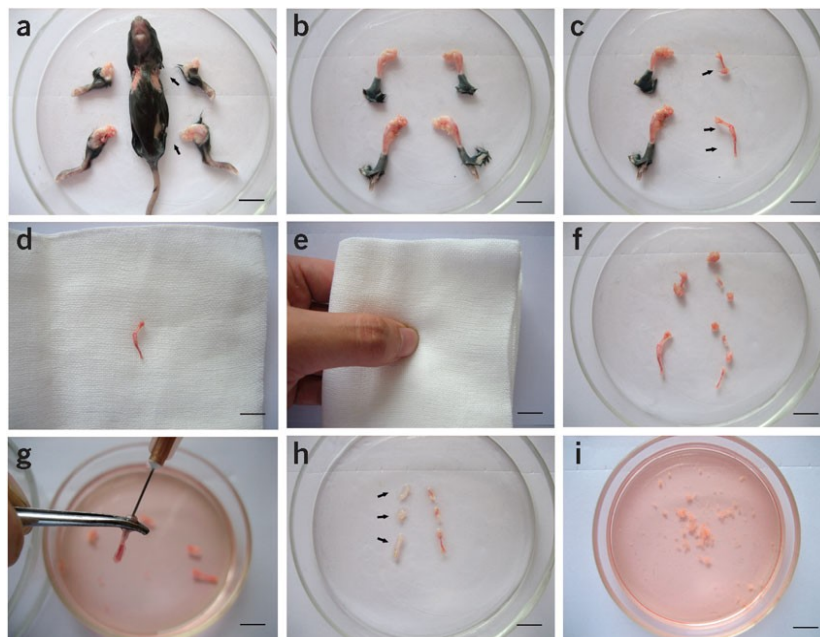


Figura.3 Protocollo di isolamento di cellule stromali primarie murine.

<i>Tipo Cellulare</i>	<i>Saggio eseguito</i>
MC3T3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test di proliferazione (MTT test)</li> <li>• Analisi dell'espressione genica</li> </ul>
C2C12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Saggio Reporter</li> </ul>
Cellule Stromali Murine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espressione dei geni target di Wnt signaling</li> </ul>

## Superfici Implantari

I campioni di titanio puro di grado 4 (ISO5832/2) utilizzati nell'esperimento sono stati gentilmente forniti da Sweden&Martina® (Due Carrare, PD, Italia) sotto forma di dischetti tondi con un diametro di 20mm e uno spessore pari a 1mm.

Durante la produzione delle fixture dei sistemi implantologici vengono riconosciute diverse fasi di lavorazione tra le quali il processo relativo ai trattamenti/rivestimenti delle superfici occupa un importante spazio proprio per l'importanza che riveste.

I dischetti utilizzati presentano le seguenti caratteristiche di superficie:

Polished – finitura liscia e successivamente lucidatura con paste diamantate abrasive e gommini da rifinitura.

ZirTi® –abbreviata nel lavoro SAE (sandblasted e acid etched), nasce nel 2002 quando si inizia ad utilizzare l'ossido di zirconio ZirO2 come nuovo agente per la

sabbiatura. Le superfici sono state preparate secondo protocolli brevettati che prevedono la decontaminazione dei dischetti con soluzioni a base di alcool isopropilico ed eteri metil-butilici. Dopo la fase di decontaminazione si passa alla sabbiatura con ossido di zirconio, alla mordenzatura acida che prevede passaggi alternati nei quali i dischetti vengono immersi in soluzione con idrossido di sodio e acido tetrafluoroborico, in seguito un passaggio di immersione di 6 minuti in acido solforico. I dischetti vengono lavati con acqua deionizzata ed immersi in soluzione elettrolitica con acido solforico e una tensione di 100V per raggiungere la saturazione di ossidazione. Al termine di questo processo i dischetti passati in soluzione con perossido di idrogeno per 5 minuti ed infine asciugati.

ZirTi® con rivestimento- SAE+Co, per preparare il rivestimento con assemblato di polilisina (PL) è stato seguito un protocollo brevettato. E' stata usata Tenta gel NH<sub>2</sub>(0,5 g Iris Biotech, Germania) come mezzo in fase solida presentante un legante amidico (Iris Biotech) per permettere la rottura finale dei semidendrimeri sintetizzati.

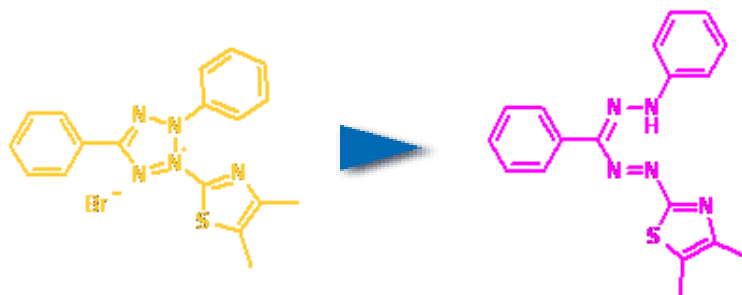
La sintesi dei PL viene iniziata con l'innesto di un amino acido (i.e glicina) al legante. Si sono ottenuti allora tre generazioni aggiungendo in sequenza molecole di Fmoc-Lys(Fmoc)-oh e terminando la sintesi con Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH. Per l'attivazione del gruppo carbossilico amminoacidico ad ogni passaggio della protocollo di sintesi è stato impiegato O-(1H-6-clorobenzotriazolo-1)-1,1,3,3-tetrametiluronium tetrafluoroborate (TCTU), mentre l'esposizione del gruppo amminico è stato ottenuta tramite la rottura del gruppo di protezione Fmoc con una soluzione 20% (v/v) di piperidina in dimetilformamide. Dopo aver rimosso la protezione del gruppo, PS-PL sono stati spaccati dalla resina e caratterizzati per



mezzo della spettroscopia di massa (MS). La polvere liofilizzata PS-PL viene risospesa in soluzione sterile 0,1 M Tris-HCl, pH7.4 a diverse concentrazioni. I campioni di titanio sono stati ricoperti per immersione in una soluzione G3 di PS-PL e deidratati a temperatura ambiente in condizioni sterili. Il potenziale della mineralizzazione del rivestimento è stato testato attraverso l'incubazione nell'SBF di Vogel a 37°C per 48 ore. Le superfici di titanio sono state accuratamente lavate in acqua deionizzata, prima e dopo la funzionalizzazione PS-PL così come la loro incubazione in SBF, quindi asciugate a freddo e analizzate al SEM (Scanning Electron Microscopy) e la EDX (electron diffraction by elemental dispersive x-rays analysis).

### **Saggio di Proliferazione Cellulare (MTT test)**

L'MTT è un test colorimetrico che permette di stimare il numero delle cellule aventi ancora attività mitocondriale, e quindi la vitalità delle cellule. Il test MTT (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) basato su un indicatore metabolico, il sale solubile di tetrazolo che, nelle cellule vitali, è ridotto nel mitocondrio ad opera di enzimi deidrogenasi attivi, a formare un cristallo insolubile in acqua di color viola.



Mtt/sale di tetrazolo (riduzione enzimatica) formazan

I cristalli solubilizzati sono quantificati con metodo colorimetrico alla lunghezza d'onda di 570 nm (assorbenza del colorante ridotto) con correzione di background a 690 nm. Il test è stato eseguito secondo le indicazioni del produttore.

Le cellule MC3T3 sono state seminate sui dischetti di titanio posti in piastre da 24 pozzetti ad una concentrazione di 50.000 cellule/pozzetto. Al fine di poter osservare una iniziale adesione cellulare e successivamente la proliferazione sono stati scelti tempi sperimentali brevi. Il test MTT è stato eseguito a 6, 48 e 96 ore.

Prima di iniziare il saggio è stato rimosso una quantità pari a 500ml di terreno da ogni pozzetto, aggiunto 50 ml di substrato MTT e riposto in incubatrice per 4 ore a 37°C. Successivamente 500ml di agente solubilizzante è stato aggiunto e lasciato overnight per eseguire infine la lettura in piastre da 96 pozzetti di 100µl prelevati da ciascun pozzetto allo spettrofotometro Multiscan Ascent (Titertek Instruments Inc., Huntsville, AL, USA).

### Saggio Reporter

Per avere un'ulteriore conferma dell'attivazione della via Wnt/ $\beta$ catenina abbiamo trasfettato le cellule mesenchimali non differenziate murine C2C12 con un vettore reporter contenente la Luciferasi Firefly, sotto il controllo di una sequenza

promotrice regolatrice che si lega al dimero TCF/  $\beta$ catenina ed un vettore controllo che esprime la Luciferasi Renilla sotto il controllo del promotore CMV. Il saggio TCF-Luc usato in questa serie di esperimenti è stato ordinato da SABioscience (Frederick, MD, USA) L'attività della Luciferasi viene successivamente calcolata come il rapporto tra la Luciferasi Firefly e Renilla. Le cellule C2C12 vengono seminate ad una densità di 150.000 cellule/pozzetto e

dopo la trasfezione secondo le indicazioni del produttore viene fatta la lettura al luminometro dotato di doppio iniettore, Glomax 20/20 ( Promega ,Italia) .

### **Espressione genica**

L'RNA totale viene ricavato dalle cellule MC3T3 seminate sui dischetti di titanio ad una concentrazione di 120.000 cellule/pozzetto. Nei vari timepoints viene aspirato il medium, staccate e lisate le cellule con 1ml di Trizol (Invitrogen). Al lisato cellulare viene aggiunto cloroformio in rapporto 1:5 e il tutto viene centrifugato a 13.000 rpm per 15' in modo da separare le varie fasi. La fase superiore viene prelevata per continuare la precipitazione degli acidi nucleici mediante alcool isopropilico. Dopo opportuni lavaggi con alcool etilico al 70%, il pellet formatesi viene risospeso in un volume adeguato di acqua RNase free e si procede alla quantificazione mediante NanoDrop ND-1000 (Celio SpA). Successivamente si passa alla sintesi del cDNA tramite retrotrascrizione ed infine alla qRT-PCR con le seguenti sonde TaqMan: Axin2 (Mm01265783\_m1); Alkaline Phosphatase (Mm00475834\_m1); Osteoprotegerin (Mm00435451\_m1); Wisp-2 (Mm00497471\_m1); b catenin (Mm00483039\_m1); Cyclooxygenase-2

(Mm01307329\_m1); Osteocalcin (for 5'-GCTGCGCTCTGTCTCTCTGA-3'; rev 5'-TGCTTGGACATGAAGGCTTTG-3' ;probe 5'-FAM-AAGCCCAGCGGCC-NFQ-3'); housekeeping gene, mouse ribosomal protein S2, ChoB (for 5'-CCCAGGATGGCGACGAT-3'; rev 5'-CCGAATGCTGTAATGGCGTAT-3'; probe, 5'-FAM-TCCAGAGCAGGATCC-NFQ-3') Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

### **Analisi statistica**

I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante Prism 4 (GraphPad, La Jolla, CA). I valori riportati sono espressi come media +/- Deviazione Standard di esperimenti eseguiti in triplicato. Le differenze tra i gruppi studiati sono stati valutati con test statistico ANOVA e sono state considerate significative per  $p < 0.05$

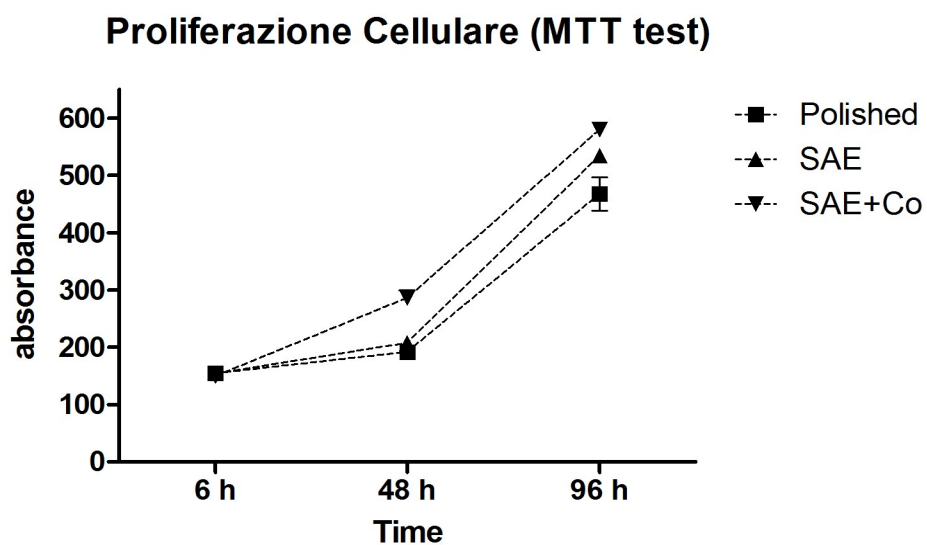


**-RISULTATI-**

### PROLIFERAZIONE CELLULARE (MTT TEST)

*I dendrimeri aumentano la proliferazione e adesione delle cellule MC3T3 nelle prime ore dopo la semina.*

Il saggio come precedentemente accennato è stato eseguito a 6, 48 e 96 ore e i risultati ottenuti tramite la lettura allo spettrofotometro sono riportati graficamente qui di sotto (*grafico 1*). Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i gruppi testati a 6 ore dalla semina. Un significativo aumento ( $p < 0.001$ ) del numero di cellule a 48 ore dalla semina si nota sulla superficie SAE+CO rispetto alle altre superfici in esame. La differenza nella proliferazione sulle superfici trattate si riduce a 96 ore ma rimane tuttavia significativa ( $p < 0.001$ ) rispetto alla tessitura liscia.



*Grafico.1 Test di vitalità di cellule MC3T3 sulle superfici di titanio testate. SAE+CO vs Polished e SAE, 48 ore ( $p<0.001$ ); SAE e SAE+CO vs Polished a 96 ore ( $p<0.001$ )*

## **ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA**

*I dendrimeri aiutano il differenziamento delle linee cellulari osteoblastiche murine.*

Per valutare gli effetti di questo rivestimento innovativo abbiamo scelto le cellule MC3T3-E1, cellule osteoblastiche murine isolate dalla calvaria di topi C57/BL6. Questo modello cellulare è un modello valido in quanto esprime alti livelli di marker fenotipici della linea degli osteoblasti in vitro e, ancora più, importante, risponde bene a stimoli quali la presenza di acido ascorbico o la topografia di superficie. Abbiamo seminato queste cellule sui dischetti Polished, SAE e SAE+CO in presenza di acido ascorbico in modo da indurre un fenotipo osteoblastico più pronunciato ed abbiamo misurato l'espressione genica di un marcatore precoce fenotipico quale la fosfatasi alcalina (ALP).

Nessuna differenza significativa si è osservata a 3 giorni dalla semina in termini di espressione della fosfatasi alcalina (*grafico.2*). Al sesto giorno invece l'espressione della fosfatasi alcalina si presentava sulla superficie SAE e ancora di più sulla SAE +Co significativamente più alta rispetto alla superficie liscia (Polished). Inoltre abbiamo scelto di indagare l'espressione di un diverso precoce marker osteoblastico, Osterix, il quale viene espresso nella fase pre-osteoblastica. I livelli trascrizionali di questo marker sono risultati significativamente più alti sui



dischetti SAE e SAE+Co rispetto ai dischetti Polished a 3 giorni. Questi valori si sono abbassati su tutte le superfici al sesto giorno rimanendo comunque, seppur di poco ma statisticamente significativo, più alto sulla superficie SAE+ Co. (grafico.3)

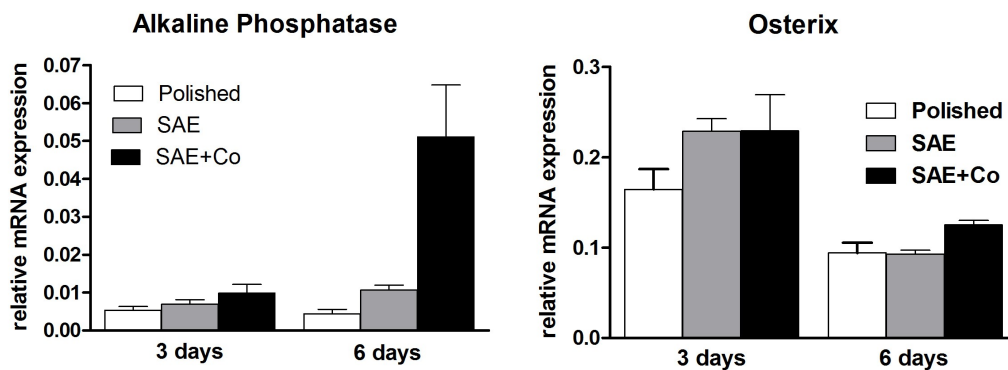


Grafico.2 Espressione della Fosfatasi Alcalina Grafico.3 Espressione di Osterix a 3 e 6 a 3 e 6 giorni su Polished, SAE e SAE+Co in giorni su Polished, SAE e SAE+Co in MC3T3 MC3T3

L'espressione di Osteocalcina (OCN) invece ha mostrato un trend diverso, infatti abbiamo notato un aumento dei livelli di mRNA di questo gene dal giorno 3 al 6 in tutti i gruppi testati. Nessuna differenza statisticamente significativa risultava al primo tempo sperimentale, ma le superfici con topografia ruvida presentavano livelli significativamente aumentati di Osteocalcina al giorno 6, inoltre la presenza di rivestimento dendrimerico ha accentuato questo aumento. (grafico.4)

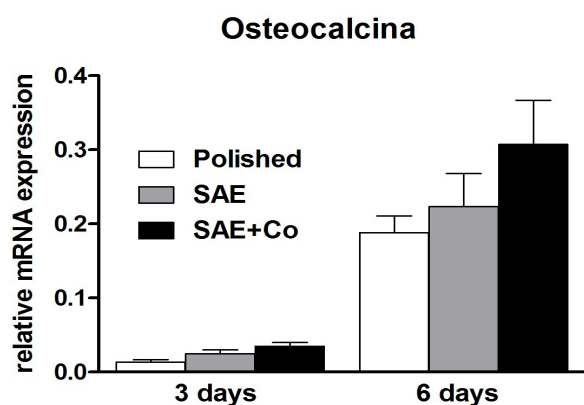


Grafico.4 Espressione dell' Osteocalcina a 3 e 6 giorni su Polished, SAE e SAE+Co in MC3T3

*Il rivestimento dendrimerico stimola l'attivazione della via canonica di Wnt*

Siccome la fosfatasi alcalina è un noto gene target della via canonica di Wnt abbiamo proceduto nel controllare se questa via è influenzata dalla presenza del rivestimento dendrimerico nelle cellule MC3T3. Si è analizzato l'espressione di Wisp-2 (grafico. 5) e Osteoprotegerina (grafico. 6), geni sotto il controllo della via canonica di Wnt sulle superfici Polished, SAE e SAE+Co e si è notato un aumento dei livelli trascrizionali di questi geni sulla superficie SAE+Co dopo 6 giorni di coltura.

*Il rivestimento dendrimerico stimola la regolazione della via Wnt*

Poiche la Fosfatasi Alcalina è nota essere un gene bersaglio Wnt, abbiamo proceduto ad investigare se questa via di segnalazione è influenzata dalla presenza di questo biorivestimento superficiale in cellule MC3T3. Abbiamo analizzato l'e-

spressione di Wisp-2 (*grafico.5*) e di Osteoprotegerina (*grafico.6*), geni controllati da questa via, sulle superfici Polished, SAE e SAE+Co. Al giorno 6 di coltura abbiamo assistito ad un aumento dei livelli trascrizionali dei geni in esame sui dischetti con superficie SAE+Co.

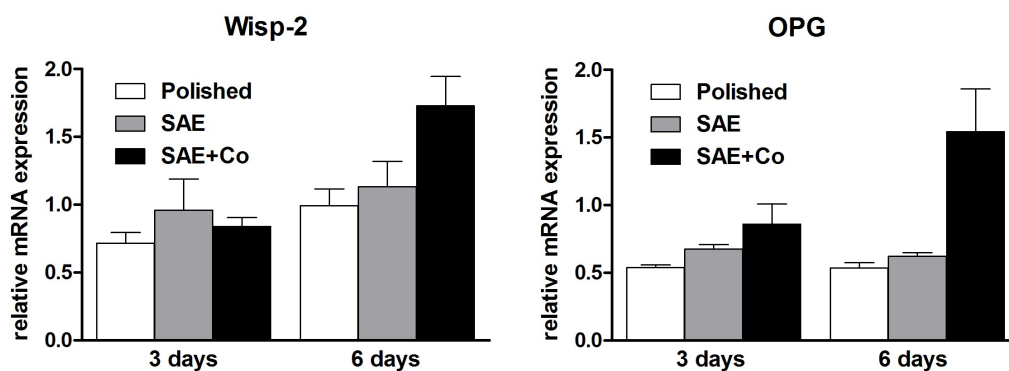


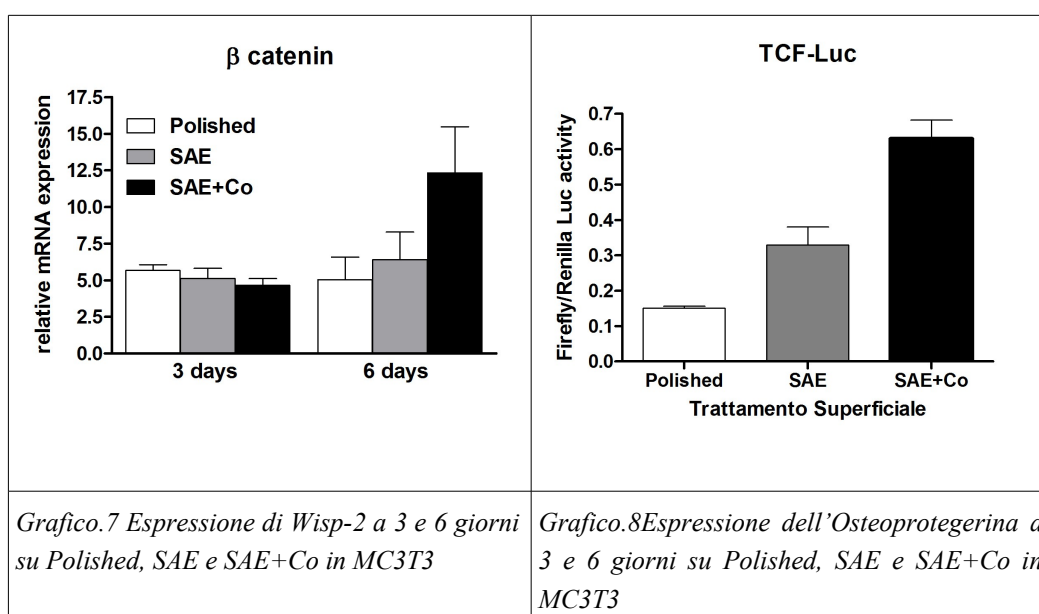
Grafico.5 Espressione di Wisp-2 a 3 e 6 giorni su Polished, SAE e SAE+Co in MC3T3

Grafico.6 Espressione dell'Osteoprotegerina a 3 e 6 giorni su Polished, SAE e SAE+Co in MC3T3

Inoltre, i livelli di mRNA di  $\beta$ -catenina (*grafico.7*), uno dei fattori trascrizionali necessari per la cascata di segnalazione assieme al TCF, erano più alti sulla superficie SAE+Co al giorno 6. Successivamente è stata misurata direttamente l'attività trascrizionale b-catenina/TCF mediante un saggio reporter (*grafico.8*). Per questo saggio è stata scelta una linea cellulare mesenchimale murina non differenziata, C2C12, una linea largamente utilizzata per studiare questa via di segnalazione. Le cellule sono state seminate sui dischetti di titanio e trasfettate con vettore reporter contenente il gene per la luciferasi *Firefly* sotto il controllo di un elemento di legame per b-catenina/TCF. Con il legame b-catenina/TCF al promotore, le cellule

trasfettate esprimono la luciferasi che emette un segnale luminoso che viene captato e misurato da un luminometro. Per la normalizzazione dei dati, le cellule sono state cotrasfettate con un plasmide contenente il gene per la luciferasi Renilla il quale è sotto il controllo di un promotore costitutivamente attivo. Stimolando le cellule con Wnt3a ricombinante abbiamo osservato un aumento della bioluminescenza sulle superfici SAE e SAE+Co. Valutando questi risultati nell'insieme si vede come sulle superfici con rivestimento dendrimerico si osservi un aumento della stimolazione della via Wnt/b-catenina ed un aumento dell'espressione dei geni target di Wnt nelle cellule mesenchimali murine.

Inoltre, i livelli mRNA di  $\beta$ -catenina (*grafico.7*), uno dei fattori di trascrizione richiesti per questa cascata di segnalazione assieme al TCF, si presentano più alti sulla superficie SAE+Co a 6 giorni. Per poter misurare in modo diretto l'attività trascrizionale  $\beta$ -catenina/TCF (*grafico.8*) abbiamo scelto un saggio reporter ed eseguito il test su cellule non differenziate murine C2C12 le quali presentano un modello vastamente utilizzato per lo studio di questa via. Come si nota dai grafici abbiamo un aumento della bioluminescenza sulle superfici SAE e SAE+Co. Presi nell'insieme questi dati mostrano come il rivestimento dendrimerico aumenta l'attivazione della via di Wnt e l'espressione dei geni target in cellule mesenchimali.

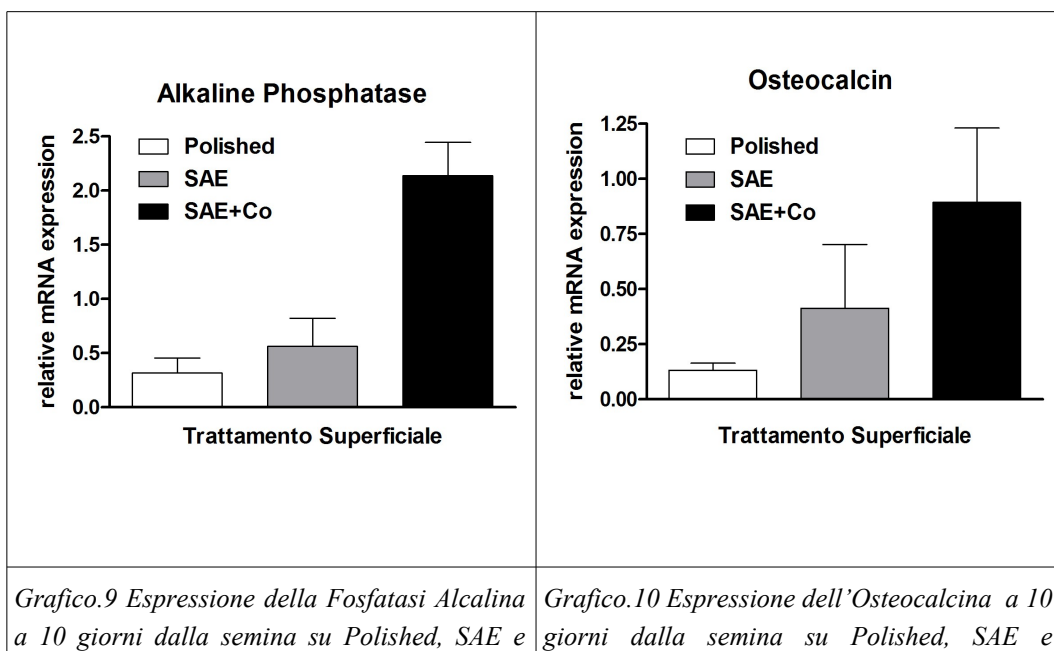


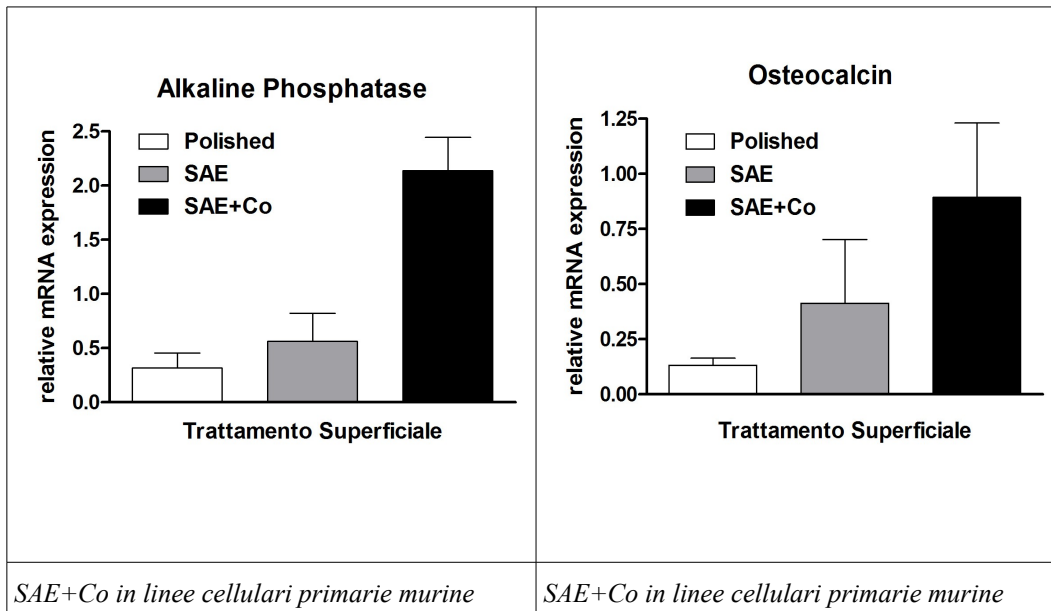
### *I dendrimeri stimolano il differenziamento in cellule murine primarie*

In modo da poter confermare i risultati con delle linee cellulari, abbiamo seminato cellule stromali midollari ossee prelevate da topi CD1 sui dischetti di titanio in presenza di acido ascorbico. Come molti studi riportano, la topografia ruvida di superficie induce

*I dendrimeri migliorano il differenziamento cellulare in cellule stromali murine .*

-Per validare questa ipotesi abbiamo seminato sulle superfici di titanio e mantenuto in coltura per 10 giorni cellule midollari murine prelevate da topi con background CD1. Come ampiamente dimostrate in letteratura, le superfici con topografia ruvida stimolano l'espressione di un fenotipo osteoblastico più differenziato, che si dimostra con l'aumento di espressione di geni quali Fosfatasi Alcalina (*grafico.9*) e Osteocalcina. (*grafico.10*) In accordo con la letteratura abbiamo infatti notato un aumento dell'espressione di questi due geni nelle cellule primarie, sulle superfici ruvide, ed inoltre un maggior aumento sulle superfici ruvide che presentavano anche il rivestimento dendrimerico. Questi risultati nell'insieme ci confermano l'ipotesi che il rivestimento dendrimerico favorisca il differenziamento cellulare in cellule primarie stromali.









**-DISCUSSIONE-**

Il titanio risulta essere il materiale di prima scelta per impianti endo-ossei ad uso odontoiatrico ed ortopedico. Questo materiale possiede buona biocompatibilità e proprietà meccaniche adeguate da fungere come sostituto di elementi dentari. Protocolli recenti chirurgici, comunque, esigono sempre di più biomateriali con capacità sempre migliori in termini di integrazione nel tessuto osseo, nel promuovere il differenziamento di cellule mesenchimali precursori degli osteoblasti e formazione di nuovo tessuto mineralizzato. Le superfici biomimetiche sembrano essere un approccio promettente nel miglioramento della risposta delle cellule ossee al biomateriale e nel promuovere il loro differenziamento. Le superfici biomimetiche mimano la struttura della matrice extracellulare (ECM), un network proteico che circonda le cellule e offre loro ancoraggio, supporto e stimoli biochimici. Sono diverse le proteine che agiscono come proteine matricellulare, come ad esempio le proteine che stimolano vie di segnalazione a cascata all'interno delle cellule legandosi con i loro organelli di adesione. Una buona parte di queste proteine presentano gruppi ripetuti di aminoacidi che, come dimostrato in letteratura, vengono riconosciuti dai dimeri delle integrine. Ed è proprio per poter mimare questo meccanismo naturale che la ricerca ha puntato nella creazione di polipeptidi sintetici come la poli(lisina) in modo da migliorare l'adesione cellulare. Nel presente lavoro si è testato un innovativo rivestimento di superficie implantare.

I dendrimeri sono dei polimeri ramificati che possono creare un network denso e molto simile a quello della matrice extracellulare mettendo così, a disposizione delle cellule sequenze ripetute che possono migliorare le interazioni della superficie del biomateriale con l'ambiente biologico. La Poli(lisina) viene largamente utilizzata come rivestimento su biomateriali nell'intento di migliorare l'adesione cellulare. L'analisi al Microscopio Elettronico a Scansione mostra cambiamenti topografici delle superfici rivestite all'ordine del nanometro portando così a cambiamenti non significativi in termini di rugosità di superficie. In questo lavoro si è notato come l'espressione dei geni target della via di Wnt viene aumentata nelle superfici che presentano il rivestimento dendrimerico rispetto alle altre. La famiglia delle glicoproteine Wnt risulta come già dimostrato fondamentale nella comprensione dei meccanismi intracellulari che governano la differenziazione cellulare. Sono stati individuati 19 geni umani Wnt che codificano per isoforme diverse di proteine. Le proteine Wnt secrete e altamente modificate in post-traslazione giocano un ruolo chiave nella crescita e omeostasi grazie alla loro partecipazione nella differenziazione cellulare, proliferazione e apoptosi. Il primo gene Wnt, Wnt-1 murino (Int-1) è stato scoperto per la prima volta da Nusse e Varmuss nel 1982, descritto come proto-oncogeno nei tumori della mammella attivato dall'integrazione con virus oncogeni murini. Il potenziale coinvolgimento dei geni Wnt nei tumori ha suscitato molto interesse tra vari ricercatori negli anni 80 e 90. Con l'identificazione dell'ortologo dell'Int-1 nel segmento Wingless nella *Drosophila* è stato coniato il nome dall'abbreviazione di Wingless e Int-1. Storicamente le proteine Wnt sono state suddivise in due grandi classi, canoniche e non canoniche, in base al ruolo che svolgono all'interno della

cellula.

In assenza di Wnt-ligandi,  $\beta$ -catenina è ancorata a un complesso formato dalle proteine Axina e Apc e dalle chinasi CK1 $\alpha$ . La fosforilazione di  $\beta$ -catenina da parte dell'enzima GSK3 porta alla sua ubiquitinazione e successiva degradazione a livello dei proteosomi (75)(Liu et al. 1999; Marikawa & Elinson 1998). Il legame di uno specifico Wnt-ligando ad un recettore della famiglia Frizzled (10 tipi nel genoma umano) ed a un corecettore LRP5 o LRP6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5 o 6) (Mao et al. 2000; Tamai et al 2000) permette la trasduzione di segnali intracellulari che portano all'attivazione di Dishevelled e alla disgregazione del complesso di degradazione della  $\beta$ -catenina (Moon et al. 2004; Wodarz & Nusse 1998) che si accumula nel citoplasma e poi si trasloca nel nucleo attivando i fattori di trascrizione TCF/LEF (73)(Huelsenken & Berhens 2002). E' stato dimostrato che l'attivazione del Wnt può essere inibita dalla secrezione della proteina Dickkopf 1 (Dkk1) legandosi e fungendo da antagonista per LRP5/6 (Mao et al 2001). Inoltre le proteine transmembrana Kremen 1 and Kremen 2 cooperano con Dkk1 per bloccare l'attivazione di Wnt. Kremen 2 può ulteriormente formare un complesso ternario con Dkk1 e LRP6 stimolando così l'endocitosi e l'eliminazione del LRP6 modulando così il segnale di Wnt. (72)( Mao et al. 2002) (*Figura 3*).

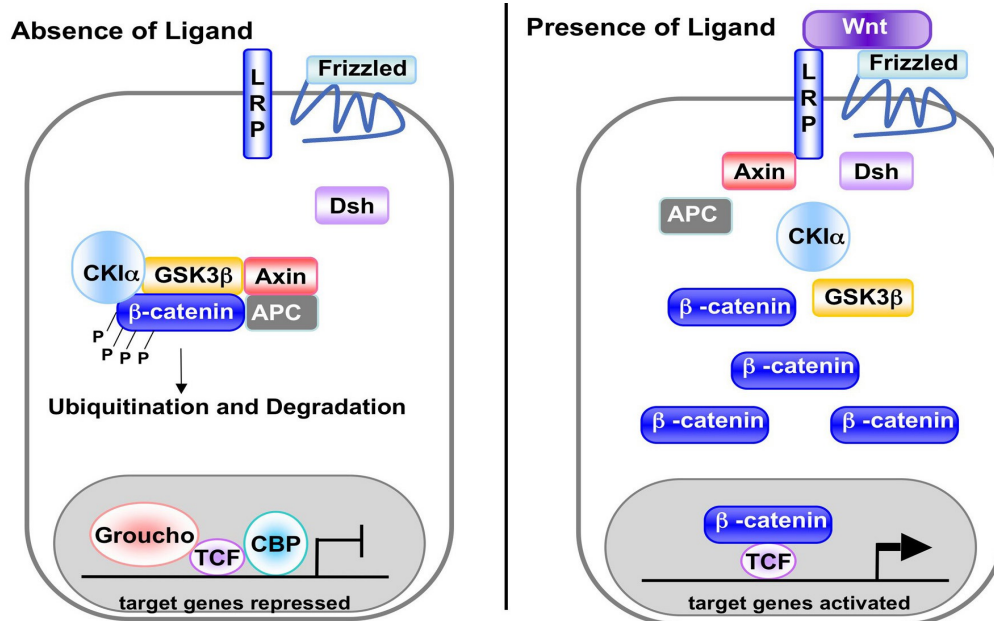


Figure.3 Attivazione della via canonica di Wnt

Per quanto riguarda invece la via non canonica di Wnt o Wnt- $\text{Ca}^{2+}$ /PCP pathway (Planar Cell Polarity), essa coinvolge alcuni ligandi e i recettori Frizzled ma non i corecettori LRP. L'attivazione di questo pathway porta al legame di Dishevelled con proteine che controllano il rimodellamento del citoscheletro. (Habas et al. 2001, 2003). Anche questa via viene attivata mediante il legame di Wnt con il suo recettore Frizzled. La via non canonica si differenzia dalla via di  $\beta$ -catenina in quanto dipende molto da tipi di G-protein che necessitano per la loro attivazione. La cascata di Dishevelled è cruciale in questa via ma non necessita della fosforilazione di tutti e tre i suoi domini. I percorsi, successivamente possono essere almeno 2 (figura.4):

1. Via  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente
2. Via PCP JNK/AP1 dipendente, che portano alla trascrizione di geni diversi

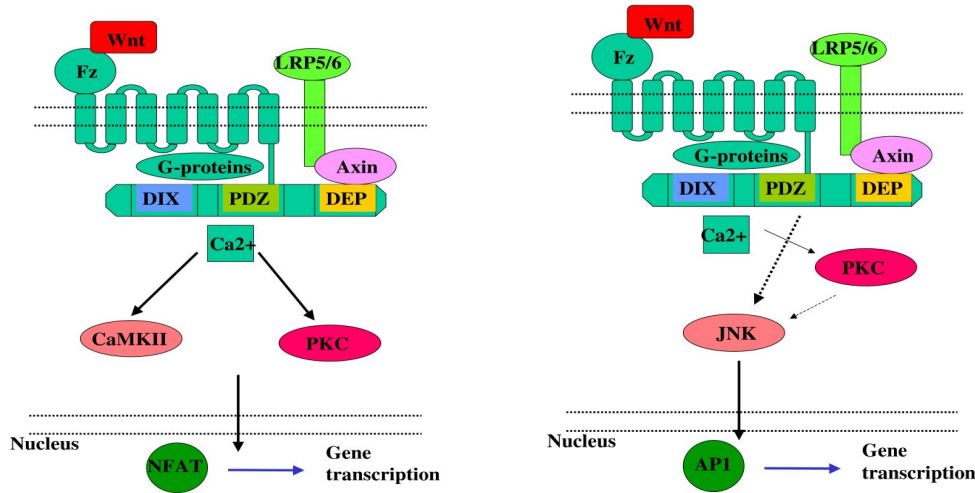


Figura 4. Attivazione della via non canonica di Wnt

Recentemente abbiamo dimostrato come questa via viene stimolata nelle superfici ruvide di titanio. Il risultato ottenuto nel saggio reporter, cioè l'aumento dell'espressione dell'attività del reporter che esprime la Luciferasi Firefly sotto il controllo del legame TCF/ $\beta$  catenina sulla superficie SAE rispetto a Polished, era un risultato atteso e già dimostrato precedentemente. Ma ciò che è più interessante è che l'attività TCF/Luc si presenta ulteriormente aumentata nelle superfici rivestite con dendrimeri in esame, come indicano i valori aumentati dei geni target di Wnt come Osteoprotegerina, Wisp-2 e fattore di trascrizione  $\beta$  catenina. I meccanismi tramite i quali il rivestimento dendrimerico aumenta l'attivazione della segnalazione Wnt rimangono ancora sconosciuti. Questi dati possono far pensare ad un comportamento dei dendrimeri in modo analogo ad un reservoir legando così i fattori di crescita Wnt e dando un'attivazione continua della cascata, o in alternativa, che la stimolazione di questa via possa essere associata esclusivamente alle caratteristiche di superfici e quindi il nuovo profilo ottenuto

mediante il rivestimento dendrimerico seppur modificato nella scala del nonometro possa ulteriormente promuovere questa via di segnalazione.

Lo sviluppo della moderna medicina è imprescindibile dal contemporaneo progresso tecnologico, che le mette a disposizione conoscenze, strumenti, materiali per poter raggiungere obiettivi di volta in volta più avanzati ed ambiziosi. Nell'ambito della biomimetica, il rivestimento dendrimerico testato può risultare di grande interesse nel migliorare le caratteristiche dei biomateriali e favorire all'implantologia una ulteriore spinta verso un'osteointegrazione più celere.

---

**BIBLIOGRAFIA**

1. Hanks C, Wataha J., Sun Z- In vitro models of biocompatibility :A review. *Dent Mater* 12:186-193, May, 1996.
  2. Murray P, Godoy C., Godoy F.-How is biocompatibility of dental biomaterials evaluated. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E258-66.
  3. Hensten-Pettersen N, Helgeland K. Evaluation of biological effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 1977;85:291-6.
  4. Singh R., Dahotre N.-Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials. *J Mater Sci: Mater Med* (2007) 18:725-751.
  5. Ghoddusi J, Sanaan A, Shahrami F. Clinical and radiographic evaluation of root perforation repair using MTA.
  6. Briso AL, Rahal V et al Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res.* 2006 Jul-Sep;20(3):219-25.
  7. Babbush C.A. : Endosseous blade implants: a research review. *J Oral Surg.* 1972;30 : 168-175.
  8. Furlong R.J., Osborn J.F. : Fixation of hip prostheses by hidroxyapatite ceramic coatings. *J Bone Joint Surg Br.* 1991; 73 : 741-745.
- Marinucci L., Balloni S- Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 719-725.



- 
10. Groessner B. and Tuan R. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces *in vitro*. *J of Cell Sci* 1992, 101 209-217.
  11. Albrektsson T., Jacobsson M. : Bone–metal interface in osseointegration. *J prosthet Dent*.1987; 57 : 597-607.
  12. Schwartz Z., Kieswetter K., Dean D.D., Boyan B.D. : Underlying mechanism at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodont Res*. 1997; 32: 166-171.
  13. Hanein D., Sabrangay H., Addadi L., et al. : Selective interactions of cells with crystal surfaces. *FASEB J*. 1993; 4 : 3111-3123.
  14. Laurer G., Wiedmann-Al-Ahmad M., et al. : The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*. 2001; 22 : 2799-2809.
  15. Marinucci L. et al-Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *The Inter J of Oral & Maxillofacial Implants*(2006) 21,5 719-725
  16. Márcia Soares Sader Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation.- *Clin. Oral Impl. Res*. 16, 2005; 667–675
  17. Sammons RL, Lumbikanonda N, Gross M, Cantzler P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration: a scanning electron microscopic study.- *Clin. Oral Impl. Res*. 16, 2005; 657–666

- 
18. Shalabi et al Implant Surface Roughness and Bone Healing: a Systematic Review *J Dent Res* 85(6):496-500, 2006
19. L. Postiglione, G. Di Domenico, L. Ramaglia, S. Montagnani, S. Salzano, F. Di Meglio, L. Sbordone, M. Vitale, and G. Rossi- Behavior of SaOS-2 Cells Cultured on Different Titanium Surfaces *J Dent Res* 82(9):692-696, 2003
20. Birte Groessner-Schreiber\* and Rocky S. Tuan- Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces *in vitro Journal of Cell Science* 101, 209-217 (1992)
21. Cooper LF (2000). A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 84:522-534.
22. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, et al. (1995). Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 29:389-401.
23. Sammons R. et al.-Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration *Clin. Oral Impl. Res.* 16, 2005 65
24. Shalabi M.M, Gortemaker A, Van't Hof M.A., Jansen J.A and Creugers N.H.J. - Implant Surface Roughness and Bone Healing: a Systematic Review *J Dent Res.* 2006 Jun;85(6):496-500
25. Mosmann, T. et al. Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates (1983) *J. Immunol. Methods* 65, 55-63

- 
26. Berridge, M. V. & Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474.
27. Ohno, M. & Abe, T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). (1991) *J. Immunol. Methods* 145, 199–203.
28. Hansen, M. B., Nielsen, S. E. & Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. (1989) *J. Immunol. Methods* 119, 203–210.
29. Hofbauer L.C., et al.-The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res* 2000,15:2-12
30. Galli C. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear Factor-Kappa B Ligand modulation by enamel matrix derivative in human alveolar osteoblasts. *J Periodontol* (2006) 77,1223-1228.
31. Aubin J, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000;11:905-913.
32. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2293-2296.
33. Huang S, Ingber D. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol* 1999; 1:E131-E138.

34. Rodriguez-Fernandez J. Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK? *Bioessays* 1999; 21:1069-1075.
35. Guo W, Giancotti F. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:816-826.
36. Schaller M, Hildebrand J, Shannon J, Fox J, Vines R, Parson J. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 1994; 14:1680-1688.
37. Giancotti F, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285:1028-1032.
38. Lavoie J, L'Allemain G, Brunet A, Mueller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996; 271:20608-20616.
39. Sherr C. Cancer cell cycle. *Science* 1996; 274:1672-1677.
- Rehenshaw M, Ren X, Schwartz M. Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO J* 1997; 16:5592-5599.
40. Howe A, Aplin A, Juliano R. Anchorage-dependent ERK signalling-mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12:30-35.
41. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 2004; 265:23-32.
42. Wennerberg K, Der C. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 2004; 117:1301-1312.
43. Takai Y, Sasaki Y, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81:153-208.
44. Ridley A. Rho family proteins: coordinating responses. *TRENDS in Cell Biology* 2001; 11:471-477.

45. Pollard T, Borisy G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112:453-465.
46. Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC $\zeta$ . *Cell* 2001; 106:489-498.
47. Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. Cooperation between mDia and ROCK in Rho induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* 1999; 1:136-143.
48. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, et al. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* 1999; 147:1023-1038.
49. Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne D, Sasaki Y, Matsumura F. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 2000; 150:797-806.
50. Watanabe N, Madaule P, Reid T, et al. p140mDia, a mammalian homolog of drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J* 1997; 16:3044-3056.
51. Hollenbeck P. Cytoskeleton: Microtubules get the signal. *Curr Biol* 2001; 11:R820-R823.
52. Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Dufresne, E., Judas, D., Iost, A. & Hardouin, P. (2000a) Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. *Journal of Biomedical Materials Research* 49: 155–166.

- 
53. Anselme, K., Linez, P., Bigerelle, M., Le Maguer, D., Le Maguer, A., Hardouin, P., Hildebrand, H.F., Iost, A. & Leroy, J.M. (2000b) The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials* 21: 1567–1577
54. Barrere, F., Van Blitterswijk, C.A., de Groot, K. & Layrolle, P. (2002) Nucleation of biomimetic Ca–P coatings on Ti6Al4V from a SBF 5 solution: influence of magnesium. *Biomaterials* 23: 2211–2220.
55. Boyan, B.D., Batzer, R., Kieswetter, K., Liu, Y., Cochran, D.L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D.D. & Schwartz, Z. (1998) Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 $\alpha$ ,25-(OH) $_2$ D $_3$ . *Journal of Biomedical Materials Research* 39: 77–85.
56. Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D. & Schwartz, Z. (1996) Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17: 137–146.
57. Boyan, B.D., Lossdorfer, S., Wang, L., Zhao, G., Lohmann, C.H., Cochran, D.L. & Schwartz, Z. (2003) Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *European Cells & Materials Journal* 6: 22–27.
58. de Groot, K., Wolke, J.G. & Jansen, J.A. (1998) Calcium phosphate coatings for medical implants. *Proceedings of The Institution of Mechanical Engineers* 212: 137–147.
59. Lausmaa, J. (1996) Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. 81: 343–361.

- 
60. Sena, L.A., Andrade, M.C., Rossi, A.M. & Soares, G.A. (2002) Hydroxyapatite deposition by electrophoresis on Ti sheets with different surface finishing. *Journal of Biomedical Materials Research* 60: 1–7.
61. Sena, L.A., Rocha, N.C.C., Andrade, M.C. & Soares, G.A. (2003) Bioactivity assessment of titanium sheets electrochemically coated with thick oxide film. *Surface and Coatings Technology* 166: 254–258.
62. Ungersböck, A., Pohler, O.E. & Perren, S.M. (1996) Evaluation of soft tissue reactions at the interface of titanium limited contact dynamic compression plate implants with different surface treatments: an experimental sheep study. *Biomaterials* 17:797–806.
- Gilmore, A. P., T. W. Owens, et al. (2009). "How adhesion signals reach a mitochondrial conclusion--ECM regulation of apoptosis." *Curr Opin Cell Biol* 21(5): 654-61
- Kilian, K. A., B. Bugarija, et al. "Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Treiser, M. D., E. H. Yang, et al. "Cytoskeleton-based forecasting of stem cell lineage fates." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(2): 610-5.
63. L. Postiglione, G. di Domenico et al. Behaviour of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *J Dent Res* 82(9):692, 2003
64. Qu Z., X. Rauch-Fan, et al. (2007). "The initial attachment and subsequent behaviour regulation of osteoblasts by dental implant surface modification." *J Biomed Mater Res A*

- 
65. Schwartz Z, E.Nasazky, et al (2005) "Surface microtopography regulates osteointegration :the role of implant surface microtopography in osteointegration" *Alpha Omegan* 98(2):9-19.
66. Galli,C., S. guizzaardi ,et al.(2005). "Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces." *J Periodontol* 76(3):364-72
67. .Bachle,M. and R.J.Kohal (2004).A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation , differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells." *Clin Oral Implants Res* 15(6):683-93
68. .Brånemark P.I. : Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983; 50 : 399-410.
69. Brånemark P.I., Zarb G., Albrektsson T. : *Tissue integrated prosthesis: osseointegration in clinical dentistry.* Quintessence Publishing Co. Chicago, 1985
70. Albrektsson T, Wennerberg A (2004a) Oral impant surfaces: Part1 and Part2- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 17:536-543/17:544-564.
71. Lausmaa, J. (1996) Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena.* 81: 343–361



72. Mao B., Wu W., Davidson G., Marhold J., Li M., Mechler B. M., Delius H., Hoppe D., Stannek P., Walter C., Glinka A., Niehrs C. (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta catenin signalling. *Nature*. 417, 664-667

73. Huelsken J., Behrens J. (2002) The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 115, 3977-3978

75. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X(2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism *Cell* 2002 Mar 22;108(6):837-47