

Valutazione istologica della risposta ossea a una nuova superficie implantare sabbiata e mordenzata: uno studio sperimentale sul coniglio

Antonio Scarano, Giovanna Iezzi*, Alessandro Quaranta**, Adriano Piattelli*

Università degli Studi "G. D'Annunzio" di Chieti, Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria, Presidente professor A. Piattelli

**Università degli Studi di Roma, Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche*

***Università degli Studi di Chieti-Pescara, Corso di Perfezionamento in Microscopia Operatoria in Chirurgia Orale*

RIASSUNTO

Diversi metodi sono stati utilizzati per ottenere una superficie che favorisca la formazione di osso perimplantare. Le caratteristiche di superficie sono determinate dalla rugosità, dalla grandezza delle particelle utilizzate per la sabbiatura e dalla composizione e impurità del mezzo sabbiante. Le cellule mostrano una diversa affinità per le superfici, ad esempio i macrofagi prediligono le superfici ruvide diversamente ai fibroblasti. La superficie dell'impianto può essere liscia (machined), o irruvidita da trattamenti con metodi sottrattivi (sabbiatura, mordenzatura) o metodi additivi (plasma-spray di titanio o idrossiapatite e altri rivestimenti). La migrazione delle cellule osteogenetiche verso la superficie del titanio è di fondamentale importanza per la guarigione ossea perimplantare. Sedici conigli New Zealand sono stati utilizzati nel presente studio. Trentadue impianti sono stati inseriti nell'articolazione del femore di coniglio. I conigli sono stati sacrificati a gruppi di quattro per ogni tempo sperimentale (7, 15, 30 e 60 gg.). Nel presente studio abbiamo ottenuta una buona guarigione ossea perimplantare e si può concludere che la superficie sabbiata con le particelle di biossido di alluminio e mordenzata rappresenta una valida tecnica di trattamento delle superfici implantari allo scopo di ottenere una migliore guarigione ossea.

SUMMARY Histological evaluation of bone response to a new, sand-blasted etched surface: an experimental study on rabbits

Different approaches are being investigated to try to obtain an ideal implant surface that is conducive to bone formation in the peri-implant region. A considerable variation exists in surface properties like topography, roughness, oxide thickness, oxide composition, microstructure, impurity levels. Cells have been shown to relate to different types of surfaces: macrophages, for example, have been shown to affect "rugophilia", while fibroblasts did not adhere to the same surfaces. Osteoblasts are responsible for the bone formation around implants. A large series of implants with different surfaces are marketed. The implant surface can be machined, or the surface can be treated with subtractive treatments like sandblasting or acid-etching or addition treatments like, for example, titanium plasma-spray, hydroxyapatite or other coatings. The migration, attachment and spreading of the osteogenic cells towards the implant surface is of fundamental importance in bone regeneration around the implants. Sixteen New Zealand rabbits were used in the present study. Thirty-two implants have been inserted in the femoral knee joint of the rabbits. In each rabbit, two implants (one in the left and one in the right knee) have been inserted. Four rabbits have been killed each time after 7, 15, 30 and 60 days. Good peri-implant bone healing was achieved in this study, therefore we can conclude that alumina dioxide sand-blasting and etching is a viable treatment for implant surfaces in order to obtain the best bone healing.

Implantologia Orale 2007;2:36-41

La riabilitazione di pazienti edentuli con impianti rappresenta una soluzione terapeutica con un'elevata percentuale di successo sia che si utilizzi la tecnica sommersa, sia che si utilizzi la tecnica non sommersa. Il mantenimento a lungo termine dell'osteointegrazione dell'impianto è influenzato soprattutto dalla densità ossea e dalle condizioni della mucosa perimplantare.

Il titanio rappresenta il biomateriale più ampiamente utilizzato nella chirurgia implantare. In natura si trova sotto

forma di minerali di titanio, è caratterizzato da un basso peso specifico, che ne favorisce l'impiego in implantologia, e può essere utilizzato sia commercialmente puro sia sotto forma di lega. Tra le leghe, quella di più largo uso per la progettazione di impianti contiene il 6% di Alluminio e il 4% di Vanadio (Ti-6Al-4V). L'alluminio viene aggiunto al titanio per aumentarne la durezza, ridurne ulteriormente il peso specifico e migliorarne il modulo di elasticità "E". In questo modo, rendendo il più simile possibile tale mo-

dulo con quello dell'osso, la lega Ti-6Al-4V permette una più equa distribuzione dei carichi nelle zone dell'interfaccia tra osso e impianto. Inoltre, l'associazione con l'alluminio e il vanadio riduce del 50% la conducibilità termica e aumenta della stessa percentuale la resistenza all'usura. Durante le procedure di lavorazione meccanica, ma anche durante l'intervento di inserimento nell'osso, il titanio è esposto all'atmosfera, e il contatto con l'aria produce, in meno di un millesimo di secondo, la rapida formazione, sulla sua superficie esterna, di uno strato di ossido di titanio di circa 10 μm .

Nel giro di un minuto lo spessore di tale strato sarà aumentato fino a circa 50-100 μm , per continuare comunque a crescere durante la sterilizzazione in ultrasuoni e in autoclave necessaria durante la procedura industriale di preparazione. Pertanto, nel momento in cui l'impianto viene inserito in bocca, gli ossidi reperibili sulla sua superficie sono il monossido di titanio (TiO), il biossido di titanio (TiO_2), il triossido di titanio (TiO_3), associati a impercettibili tracce di ossido di alluminio e vanadio. Peraltro, tra essi, il più stabile è il TiO_2 , che costituisce il composto percentualmente più rappresentato sulla superficie della lega. Durante le varie fasi chirurgiche d'inserimento dell'impianto, esso può essere danneggiato o asportato, ma si riforma istantaneamente con le stesse procedure descritte in precedenza. Tale ossido, carica negativamente l'impianto aumentandone in maniera notevole l'affinità per le differenti biomolecole, ed è in grado di passivare i suddetti materiali prevenendone la corrosione a causa della sua elevata stabilità chimica, e previene la diffusione degli ioni metallici all'interno dei tessuti, conferendo al titanio un elevato grado di biocompatibilità.

La superficie del titanio può essere preparata con differenti tecniche allo scopo di ottenere un grado di rugosità superficiale ottimale. Tale rugosità ha lo scopo di ottenere una migliore resistenza, assicurata dalla microritenzione dell'interfaccia osso-impianto rispetto alle forze di trazione e torsione. Si è visto infatti come la crescita di osso mineralizzato avvenga all'interno delle irregolarità superficiali del titanio aumentando, in questo modo, il legame che si viene a stabilire tra il tessuto osseo e il biomateriale.

Le superfici implantari possono essere di due tipi: lisce (o "machined") o rugose.

Tra le superfici rugose annoveriamo le superfici mordenzate e le superfici sabbiolate e mordenzate.

La mordenzatura acida della superficie è stata adottata come trattamento delle superfici implantari allo scopo di evitare gli inconvenienti che si possono verificare con la sabbiatura: la contaminazione del titanio con il materiale utilizzato nella sabbiatura, la non omogeneità del trattamento sull'intera superficie e i rischi di una perdita di sostanza metallica

che potrebbe ridurre la resistenza meccanica dell'impianto. La mordenzatura può essere ottenuta sia con una miscela di acido cloridrico e acido solforico ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$), sia utilizzando una miscela di acido fluoridrico e acido nitrico ($\text{HF}_2\%/ \text{HN}_3$ 10%).

Per ottenere superfici sabbiolate e mordenzate si procede a una prima fase di trattamento mediante sabbiatura con materiali a grana grossa che producono una superficie macro-rugosa; a questo segue un bagno in soluzione acida, che produce microirregolarità con conseguente aumento della superficie implantare.

Questa seconda fase viene eseguita per mezzo di soluzioni di acido cloridrico/acido solforico, oppure soluzioni di acido fluoridrico/acido nitrico. Con le superfici sabbiolate e mordenzate si ottiene un migliore ancoraggio dell'osso e si è visto che la sabbiatura fatta prima della mordenzatura ha un effetto positivo sulla forza di taglio interfacciale. Inoltre la rugosità di superficie prodotta dalla sabbiatura e dalla mordenzatura influenza i meccanismi di adesione cellulare.

Cellule simili agli osteoblasti a contatto agli impianti machined mostrano una morfologia appiattita, mentre le stesse cellule a contatto alle superfici sabbiolate e mordenzate mostrano una morfologia irregolare e molti pseudopodi. Queste irregolarità migliorano l'ancoraggio cellulare contribuendo a ottenere una migliore osteointegrazione nel caso degli impianti sabbiolati e mordenzati.

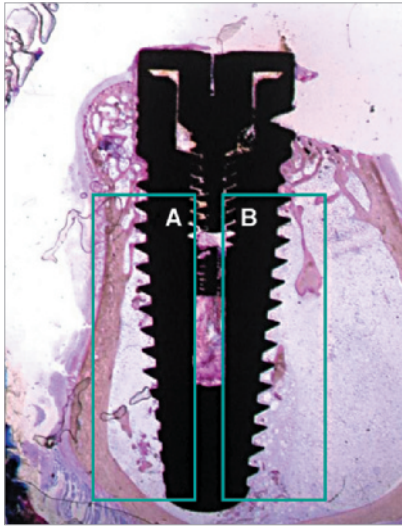
Scopo del presente studio nel coniglio è valutare la risposta ossea con una superficie ottenuta mediante sabbiatura con particelle di biossido di allumina e successiva mordenzatura acida.

MATERIALI E METODI

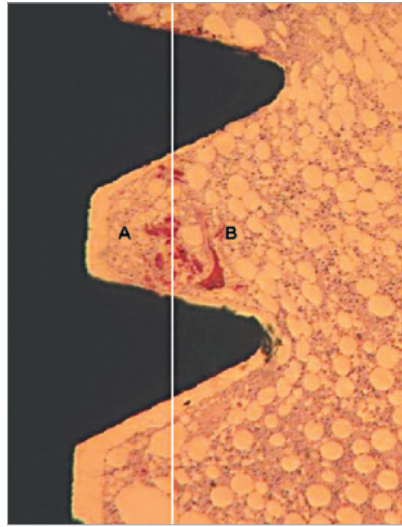
Per questo studio sono stati utilizzati impianti dentali Implagic® (Dental Tech s.r.l. Misinto, Milano, Italy) da $\varnothing 4,5 \times 13$ mm con superficie B.W.S. (Blast Wrinkled Surface), prodotti con strumenti di alta precisione.

Nella sperimentazione sono stati utilizzati in totale 32 impianti, inseriti nell'articolazione di ginocchio di 16 conigli di razza New Zealand. Questa sperimentazione è stata approvata dal Comitato Etico della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Chieti-Pescara. Ogni coniglio riceveva 2 impianti, uno nell'articolazione di sinistra e l'altro nell'articolazione di destra. Dopo l'anestesia, è stata eseguita un'incisione cutanea con elevazione dei tessuti periosteali in maniera tale da esporre la superficie ossea.

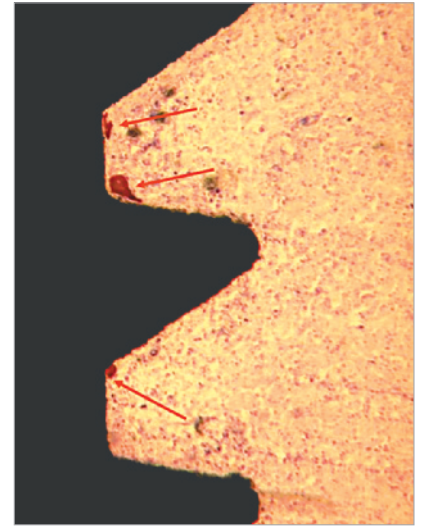
La preparazione del sito osseo è stata eseguita con fresa pilota a gradini e ultimata con una fresa conica, sotto abbondante irrigazione con soluzione fisiologica. Dopo l'inseri-



1. Impianto sezionato lungo l'asse maggiore. Le aree a e b sono le aree valutate nel presente studio. Blu di toluidina e fucsina acida 12×.



2. Dopo 7 giorni si osservano piccole trabecole ossee nelle aree di valutazione. Blu di toluidina e fucsina acida 50×.



3. Altro campo di un preparato istologico dopo 7 giorni, si osserva neoformazione di osso soprattutto nella concavità della spira, mentre non si osserva attività osteoblastica in corrispondenza delle convessità. Blu di toluidina e fucsina acida 50×.

mento degli impianti, il periostio e la fascia venivano suturati con Vicryl (Johnson and Johnson) e la cute con Ethibond Excel (Johnson and Johnson). Tutti gli animali hanno superato il periodo post-operatorio.

I conigli sono stati sacrificati, con una overdose di Tanax, a gruppi di 4 dopo 7, 15, 30, e 60 giorni. Tutti e 32 gli impianti sono stati recuperati. Gli impianti sono stati rimossi insieme ai tessuti circostanti, mediante una block-section e fissati immediatamente in formalina tamponata al 10%.

I pezzi sono stati successivamente processati per ottenere sezioni sottili con il Precise Automated System (Assing, Roma). I campioni sono stati disidratati in una serie di alcohols a concentrazioni crescenti e infiltrati successivamente in resina Technovit 7200 VLC (Kulzer, Wehrheim, Germania). I blocchetti così ottenuti sono stati sezionati a circa 150 μm e abrasi fino a 20-30 μm .

Per ogni impianto sono state ottenute tre sezioni. I vetrini sono stati quindi colorati con fucsina acida e blue di toluidina ed esaminati con un microscopio Laborlux (Leitz, Wetzlar, Germania).

L'analisi istomorfometrica è stata eseguita utilizzando un Computer AMD 1800 Mz, interfacciato con una scheda video digitalizzatrice a colori reali con ingresso RGB (MatrixVision GmbH, Oppenweiler, Germania), una telecamera a colori 3CCD, JVC KY-F55B (JVC, Yokohama, Giappone) e un applicativo software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc. Immagini & Computer Snc Milano, Italy). Le immagini acquisite sono state analizzate utilizzando il

software menzionato in precedenza per calcolare la percentuale di contatto osso-impianto e la quantità di osso che circondava l'impianto, valutando il tessuto a 1 mm di distanza dall'impianto.

RISULTATI ISTOLOGICI

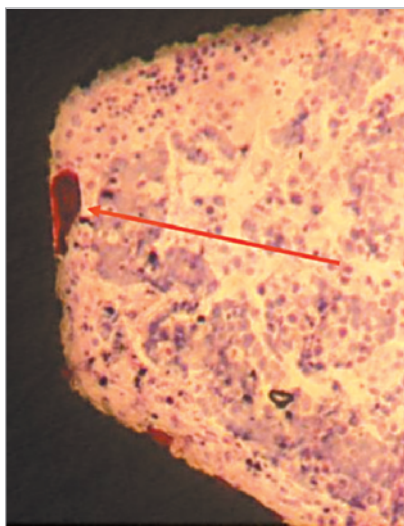
7 giorni

A piccolo ingrandimento si osservava del tessuto colorato intensamente con la fucsina acida. A maggiore ingrandimento si osservavano numerose trabecole ossee in neoformazione a stretto contatto con la superficie implantare (figure 1-3). Molti osteoblasti erano presenti a contatto diretto con la superficie dell'impianto, e in queste zone si evidenziava l'apposizione di matrice osteoide direttamente sulla superficie implantare (figura 4).

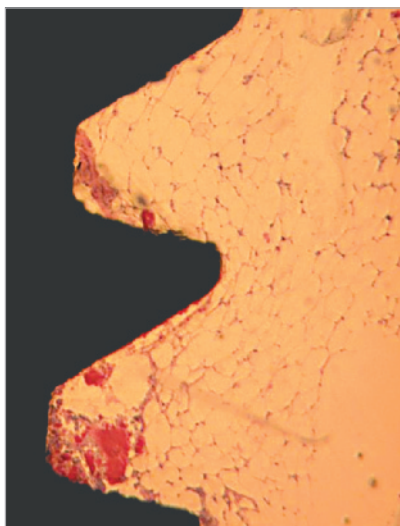
La matrice osteoide era prevalentemente non mineralizzata e non si colorava con la fucsina acida. La percentuale di contatto osso-impianto era del 14,5%.

14 giorni

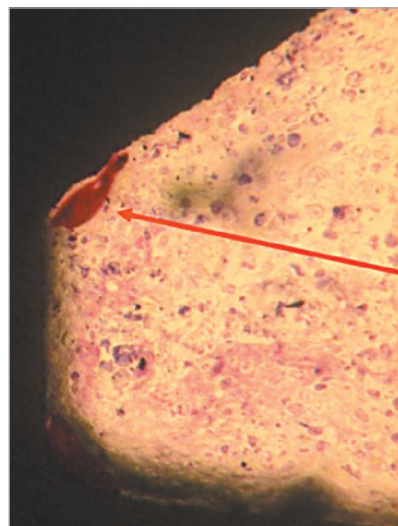
Tra le spire dell'impianto si evidenziavano numerose zone di neoformazione ossea; inoltre, erano presenti osteoblasti secernenti nuova matrice osteoide (figure 5, 6). Non si riscontravano mai cellule multinucleate o cellule infiammatorie con significato patologico. La percentuale di contatto osso-impianto era del 21,67%.



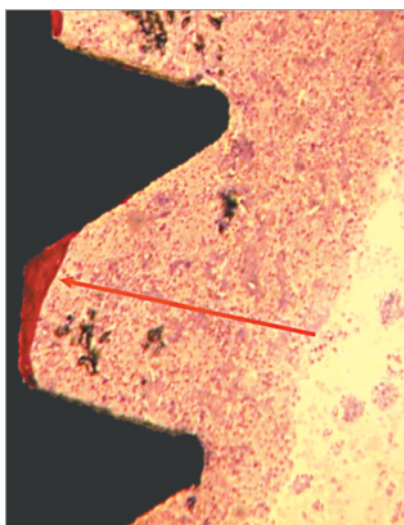
4. Particolare che conferma la neoformazione ossea nello spazio compreso delle spire. Blu di toluidina e fucsina acida 100x.



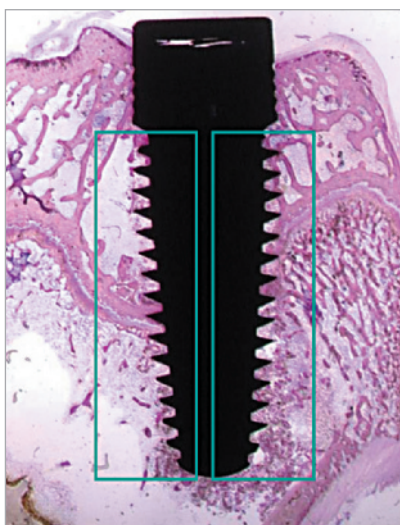
5. Dopo 14 giorni di guarigione si osserva l'aumento della quantità di osso a diretto contatto con la superficie implantare. Blu di toluidina e fucsina acida 50x.



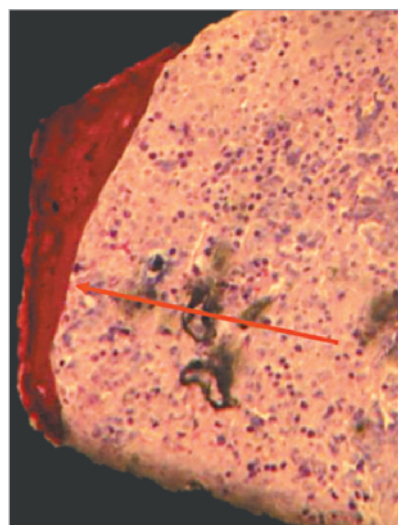
6. Particolare dell'osso a contatto con la superficie implantare. Blu di toluidina e fucsina acida 100x.



7. Dopo 30 giorni si osserva una maggiore quantità di osso maturo di tipo trabecolare. Blu di toluidina e fucsina acida 50x.



8. Immagine di impianto dopo 60 giorni, si sottolinea che le aree di valutazione sono quelle circondate dai riquadri verdi. Blu di toluidina e fucsina acida 12x.



9. L'osso presente nelle concavità delle spire si presenta maturo con piccole lacune osteocitarie. Blu di toluidina e fucsina acida 100x.

30 giorni

Era possibile osservare un intimo contatto tra osso e impianto, in quanto non erano presenti gaps all'interfaccia né era presente interposizione di tessuto connettivo fibroso (figura 7). La neoformazione ossea avveniva soprattutto verso la superficie dell'impianto (direzione implantopeta). La percentuale di contatto osso-impianto era del 34,5%.

60 giorni

L'attività osteoblastica era scarsa e, solo in alcuni campi, si osservavano alcuni osteoblasti secernenti matrice osteoide (figure 8-9).

Non si osservavano cellule multinucleate o cellule tipiche dell'infiammazione acuta o cronica. La percentuale di contatto osso-impianto era del 58,83%.

DISCUSSIONE

Diverse ricerche dimostrano l'importanza delle caratteristiche della superficie degli impianti per raggiungere un migliore risultato e in particolare si è visto che le caratteristiche di superficie possono influenzare il comportamento delle cellule responsabili della formazione di osso.

Nel nostro studio, l'analisi istomorfometrica non ha mostrato una relazione tra l'aumento della densità ossea perimplantare e la rugosità della superficie. Negli impianti sabbiati, dopo 4 settimane, l'osso maturo appare in diretto contatto con la superficie implantare, ma in molte aree è interposta matrice osteoide non ancora mineralizzata. In altre aree del perimetro implantare è possibile osservare la formazione di matrice osteoide direttamente sulla superficie implantare.

La formazione di osso all'interfaccia osso-impianto è un processo che implica la migrazione e proliferazione delle cellule, seguita dalla sintesi, dalla deposizione e mineralizzazione della matrice ossea. Tutte queste fasi che prevedono la neoapposizione di osso intorno agli impianti possono essere influenzate dalla rugosità superficiale, anche se un cambiamento della morfologia superficiale può influenzare anche l'energia di superficie e la composizione chimica.

Negli ultimi 10-15 anni sono state proposte superfici implantari sabbiate, plasma spray oppure superfici rese rugose con l'uso di acidi, allo scopo di ridurre i tempi di guarigione ossea, influenzando il comportamento delle cellule osteoblastiche.

Non è stata ancora definita con certezza l'ottimale rugosità di superficie, anche se è stato suggerito che una rugosità di 1,5 μm tendeva a ridurre i tempi di una risposta ossea rispetto a quelli osservati intorno a superfici con minore o maggiore rugosità.

È noto che cambiando la geometria e la microporosità di un biomateriale è possibile renderlo maggiormente osteoconduttivo o addirittura osteoinduttivo. La rugosità di superficie influenza la bagnabilità del biomateriale nel contenuto acquoso e proteico presente nel sito implantare, rendendo possibile l'assorbimento di proteine BMP (morfo-genetiche), OP (osteogenetic proteins), fibronectina e osteopontina liberate nel sito implantare in seguito all'intervento chirurgico.

Risulta chiaro come la composizione, la rugosità, la topografia e l'energia di superficie giochino un ruolo importante durante le fasi iniziali dell'integrazione dell'impianto.

È ampiamente dimostrato come impianti sabbiati abbiano mostrato dei valori di percentuale di contatto osso-impianto più elevati degli impianti machined.

La rugosità di superficie determina un aumento della proliferazione degli osteoblasti e della differenziazione delle cel-

lule preosteoblastiche, nonché la migrazione verso il sito implantare e un aumento di produzione di fosfatasi alcalina, TGF beta, PGE2.

La fosfatasi alcalina svolge un ruolo fondamentale nei processi di mineralizzazione della matrice osteoide e dell'osso immaturo, mentre il TGF beta e la PGE2 hanno la funzione di stimolare le cellule preosteoblastiche a differenziarsi e a migrare verso la superficie implantare.

Osteoblasti coltivati su superfici più rugose hanno mostrato un'aumentata produzione di matrice e un'aumentata espressione di fosfatasi alcalina. Il maggiore assorbimento di proteine da parte di superfici rugose potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nella rigenerazione ossea attraverso una maggiore concentrazione sull'impianto di proteine coinvolte nei processi di neoformazione ossea. La rugosità di superficie influenza la bagnabilità del biomateriale nel contenuto acquoso e proteico presente nel sito implantare, rendendo possibile l'assorbimento di proteine BMP (morfo-genetiche), OP (osteogenetiche), fibronectina e osteopontina liberate nel sito implantare in seguito all'intervento chirurgico.

La bagnabilità della superficie svolge dunque un ruolo importante sull'assorbimento proteico; è una caratteristica fondamentale per ottenere un buon legame tra le proteine disperse nella matrice extracellulare e il biomateriale. La superficie implantare osteoconduttiva risulta utile nelle condizioni di carico immediato.

Nel presente studio si è potuto notare la buona guarigione ossea intorno a impianti BWS® (Blast Wrinkled Surface) e mordenzati. Sono state quindi ottenute delle risposte biologiche tipiche delle superfici biocompatibili e in nessun caso si è osservato un infiltrato infiammatorio acuto o cronico, in quanto la diversa morfologia di superficie va a influenzare positivamente il comportamento degli osteoblasti, soprattutto nelle prime fasi della guarigione.

Nel presente studio abbiamo ottenuto una buona guarigione ossea periimplantare e si può concludere che la superficie sabbiata con le particelle di biossido di allumina e mordenzata rappresenta una valida tecnica di trattamento delle superfici implantari allo scopo di ottenere una migliore guarigione ossea.

Ringraziamenti

Si ringraziano il dottor Carlo Mancino e il dottor Stefano Nocelli per la preziosa collaborazione tecnica prestata.

Corrispondenza: Antonio Scarano

via Foggia 205, San Giovanni Rotondo (FG)
ascarano@unich.it

BIBLIOGRAFIA

1. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Surg* 1969;3:81-100.
2. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981;9:15-25.
3. McKinney RV Jr, Stefflick DE, Koth DL, Singh BB. The scientific basis for dental implant therapy. *J Dent Educ* 1988;52:696-705.
4. Klokkevold P, Nashimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Impl Res* 1997;8:442-447.
5. Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:668-74.
6. Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:779-84.
7. Piattelli A, Piattelli M, Scarano A. Simultaneous demonstration of alkaline and acid phosphatase activities in bone, at bone implant interface and at the epiphysal growth plate in plastic embedded undemineralized tissue. *Biomaterials* 1997;18:545-549.
8. Piattelli A, Scarano A, Quaranta M. High precision, cost-effective system for producing thin sections of oral tissues containing dental implants. *Biomaterials* 1997;18:577-579.
9. Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behaviour of cells. *Int J Maxillofac Implants* 1988;3:231-246.
10. Mustafa K, Wennenberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Silva Lopez B, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Impl Res* 2001;12:515-525.
11. Wennenberg A. On surface roughness and implant incorporation. Ph D Thesis, Department of Biomaterials/Handicap Research, Göteborg University, 1996.
12. Han CH, Jahansson CB, Wennenberg A, Albrektsson T. Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. *Clin Oral Impl Res* 1998;9:1-10.
13. Magan A, Ripamonti U. Geometry of porous hydroxyapatite implants influences osteogenesis in baboons (*Papio ursinus*). *J Craniofac Surg* 1996;7:71-8.
14. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. *Clinical Implant Dent Rel Res* 2000;2:120-129.
15. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennenberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Impl Res* 2001;12:128-134.
16. Solskolne WA, Cohen S, Sennerby L, Wennenberg A, Shapira L. The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF- α and PGE₂. *Clin Oral Impl Res* 2002;13:86-93.
17. Goransson A, Jansson E, Tengvall P, Wennenberg A. Bone formation after 4 weeks around blood-plasma-modified titanium implants with varying surface topographies: an in vivo study. *Biomaterials* 2003;24:197-205.
18. Frenkel SR, Simon J, Alexander H, Dennis M, Ricci JL. Osseointegration on metallic implant surfaces: Effects of microgeometry and growth factor treatment. *J Biomed Mater Res* 2002;63:706-13.
19. Scarano A, Spoto G, Vrespa G, Iezzi G, Strocchi R, Piattelli A. Superficie implantari plasma-spray e machined: Valutazioni biochimiche ed istomorfometriche. *Il Dentista Moderno* 2002;8:91-99.
20. Goransson A, Jansson E, Tengvall P, Wennenberg A. Bone formation after 4 weeks around blood-plasma-modified titanium implants with varying surface topographies: an in vivo study. *Biomaterials* 2003;24:197-205.
21. Degidi M, Scarano A, Iezzi G, Piattelli A. Histologic analysis of an immediately loaded implant retrieved after 2 months. *J Oral Implantol* 2005;31:247-54.