



**CONFIDENTIAL CONFIDENTIAL CONFIDENTIAL**

**RAPPORTO SULL'ADESIONE CELLULARE IN-VITRO  
A IMPIANTI DENTALI TITANMED CON TU**

**RIF.:** D.d.t. TITANMED S.r.l.

**Ns. rif.:** 3101100362

**Scritto da:**

Dr. Marco MORRA

.....

Dr.a Clara CASSINELLI

.....

**copie #:** 1

Il testo e le foto di questo rapporto sono conservati su disco presso NBR

**CONFIDENTIAL CONFIDENTIAL CONFIDENTIAL**

## **Scopo del lavoro**

Lo scopo del lavoro era lo studio di come delle cellule di tipo osteoblastico aderiscono alla superficie degli impianti dentali in titanio BRANE TU, prodotti da Titanmed S.r.l.

Le proprietà chimico-fisiche delle superfici dei materiali giocano un ruolo fondamentale nel determinare il destino di dispositivi implantari a contatto con l'osso. La topografia della superficie, in termini di tipo di ruvidità, di porosità, influenza l'adesione, la proliferazione e la differenziazione della cellula: i dettagli strutturali del corpo della cellula sono la risposta agli stimoli provenienti dal contatto cellula-superficie. Sulla base di queste considerazioni, abbiamo valutato l'adesione e la proliferazione in differenti tempi sperimentali di cellule SaOS2 di tipo osteoblastico.

La cellula SaOS-2 è una linea cellulare continua che proviene dall'osteosarcoma umano, omogenea e che mostra un fenotipo stabile, non selettiva e che condivide molte delle proprietà degli osteoblasti non trasformati.

## **Materiali**

Sono stati svolti test su 6 campioni forniti da Titanmed s.r.l., perfettamente confezionati e sterili.

In particolare, come riportato nel documento di accompagnamento, sono stati analizzati 6 impianti BRANE TU 5 X 15 mm, lotto 142.

## **Metodi**

Le cellule usate per i test d'adesione sono cellule SaOS-2 di tipo osteoblastico dell'osteosarcoma umano, acquistate dal "Centro Substrati Cellulari dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna". I test di adesione cellulare sono stati condotti in accordo con i protocolli elencati nella letteratura internazionale.

Una sospensione di  $1.05 \pm 0.13 \times 10^5$  cellule SaOS-2 (ottenuta aggiungendo 2 ml di soluzione tripsina/EDTA al monostrato dentro ad una fiala Falcon T75) in 2.5 ml di McCoy's 5A medio, potenziato con 15% Foetal Calf Serum, L-glutamina, penicillina, streptomina e amfotericina B (tutti acquistati dalla GIBCO, INVITROGEN Srl, San Giuliano Milanese) è stata introdotta in micropiastre a 12 pozzetti sterili in polistirene (12-well multiwell plates, Cell, Star, Greiner One™). Allo stesso tempo, i campioni sono stati estratti dal loro confezionamento sterile sotto una cappa a flusso laminare e posizionati nei pozzetti. Le piastre della coltura vengono poi posizionate in un'incubatrice a 37°C, con il 5% di CO<sub>2</sub> ed il 98% di umidità relativa. I campioni sono stati rimossi dai pozzetti ad un preciso tempo sperimentale (6, 24 e 72 ore), lavati delicatamente con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Gibco, INVITROGEN Srl), al fine di rimuovere qualsiasi cellula che non avesse aderito e fissati usando glutaraldeide al 4% in DPBS per almeno 48 ore. A seguito della fissazione, le cellule sono state disidratate immergendole per

approssimativamente 48 ore in ognuno di una serie di passaggi alcool-acqua (il cui passaggio finale era etanolo puro, Fluka, Sigma-Aldrich Srl, Milano). I campioni fissati e disidratati sono stati posizionati in contenitori per campioni sui supporti adatti alla conduzione adesiva e rivestiti con un sottile strato d'oro (Agar Sputter Coater).

Le osservazioni sono state eseguite tramite microscopio a scansione elettronica (SEM) EVO MA 10 SEM. I parametri operativi (la distanza lavorativa (WD), l'alta tensione elettronica (EHT), la magnificazione (MAG), le unità di misura, il rilevatore (Segnale A) usati nel corso delle osservazioni sono riportati nella parte più bassa di ogni immagine.

Per fornire una migliore comprensione, la presentazione di immagini allegata inizia con due immagini, ottenute a 2000x e a 5000x della nuda superficie dell'impianto, senza cellule che aderiscono.

## **Risultati**

Le immagini della nuda superficie dell'impianto mostrano la tipica topografia ottenuta attraverso il trattamento elettrochimico. La caratteristica più peculiare è la presenza di pori e "vulcani", la cui dimensione va da poche decine di nanometri fino a pochi micrometri. Le immagini ottenute mostrano immediatamente che la superficie dell'impianto Titanmed BRANE TU consente l'adesione e la crescita di cellule SaOS-2. Come conseguenza, la prima chiara indicazione, che non bisognerebbe mai dare per scontata senza prova diretta, è che le caratteristiche chimico-fisiche e topografiche della presente superficie non favoriscono effetti citotossici e non impediscono l'adesione di cellule osteoblaste. L'osservazione, tramite microscopio ottico ad inversione, delle cellule nei pozzetti, in aree non coperte dal campione, permette di affermare che le cellule hanno raggiunto la confluenza nel tempo sperimentale scelto; inoltre queste cellule mostrano la stessa morfologia di quelle cresciute nel pozzetto di controllo (che è il pozzetto che contiene solo le cellule, senza gli impianti).

Le immagini ottenute dopo un contatto di 6 ore (fig. 1-10) mostrano sia cellule che si sono già diffuse sia cellule che ancora mantengono la forma arrotondata tipica della sospensione, che è la forma iniziale della cellula al momento del contatto con la superficie dell'impianto. Il corpo delle cellule, sia per le cellule espanse sia per quelle globulari, mostra un alto numero di filopodi e pseudopodi che si estendono ovunque e cercano di stabilire connessioni con le cellule vicine.

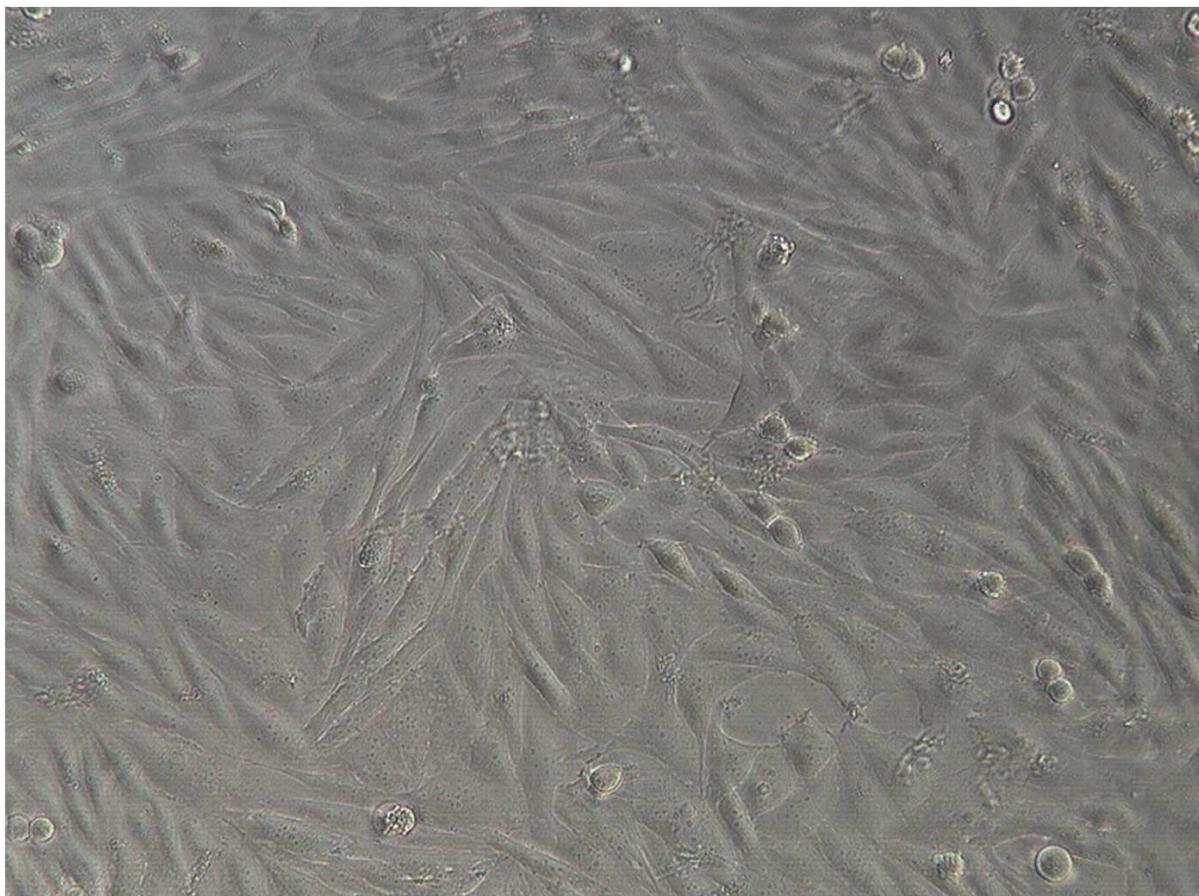
Dopo un contatto di 24 ore (fig. 11-23) le immagini mostrano una chiara progressione nella diffusione del corpo delle cellule e della colonizzazione della superficie. È ancora possibile osservare alcune cellule globulari tuttavia in percentuale più bassa rispetto a quelle dopo un contatto di 6 ore. La topografia della superficie è sempre più nascosta dallo strato di cellule in crescita. La fig. 21, ottenuta a 35.000x, mostra un filopodo che entra in un poro, come per portare la cellula ad ancorarsi: la scala a barre mostra che la dimensione del filopodo e del poro è nell'ordine di poche decine di nanometri. Dopo 72 ore (fig. 24-34) la maggior parte della superficie

dell'impianto è coperta da uno strato conforme di cellule, che nasconde pori e crateri. Le cellule globulari notate stanno di fatto spargendosi sul denso strato cellulare che ricopre la superficie. Tutte le immagini, specialmente quelle ottenute ad una magnificazione più alta, mostrano un sovrastrato di cellule continuo ed omogeneo, la cui morfologia è appena percepibile, contrariamente all'osservazione effettuata dopo 6 e dopo 24 ore. In breve, questi dati mostrano che, dopo l'iniziale processo di adesione cellulare, è avvenuta una significativa crescita e proliferazione di cellule osteoblaste sulla superficie dell' impianto.

### **Conclusioni**

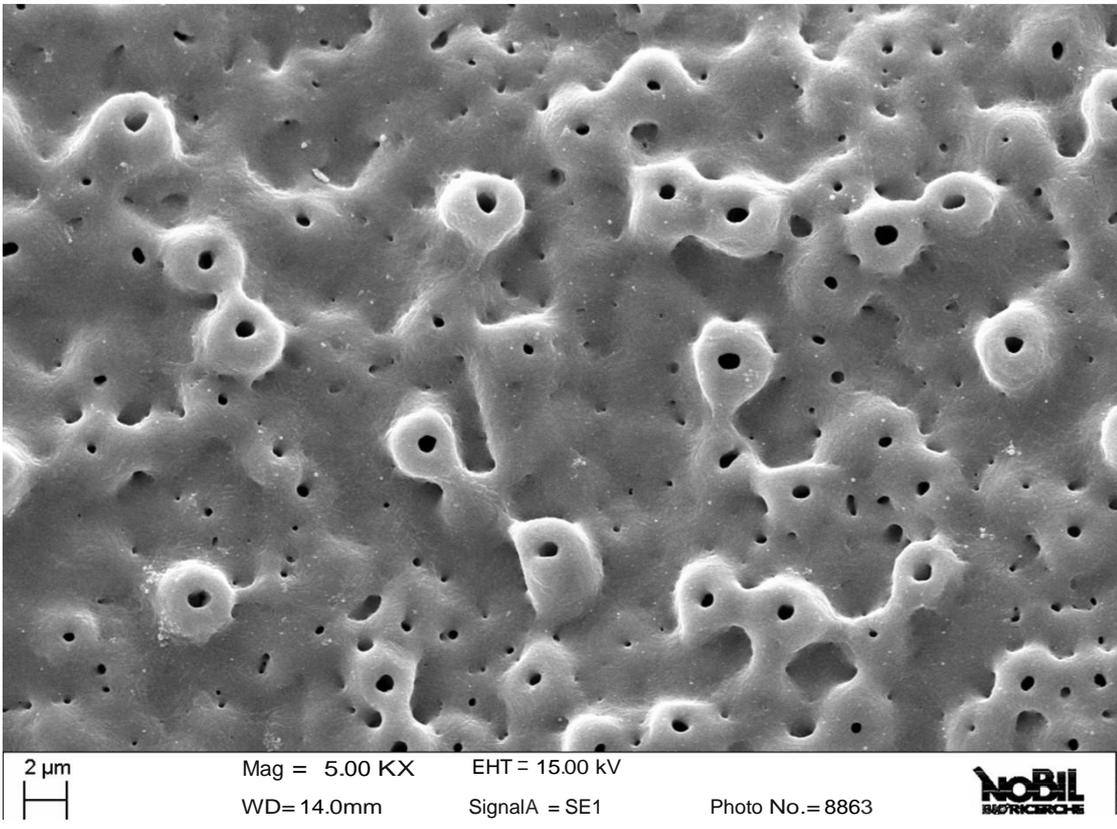
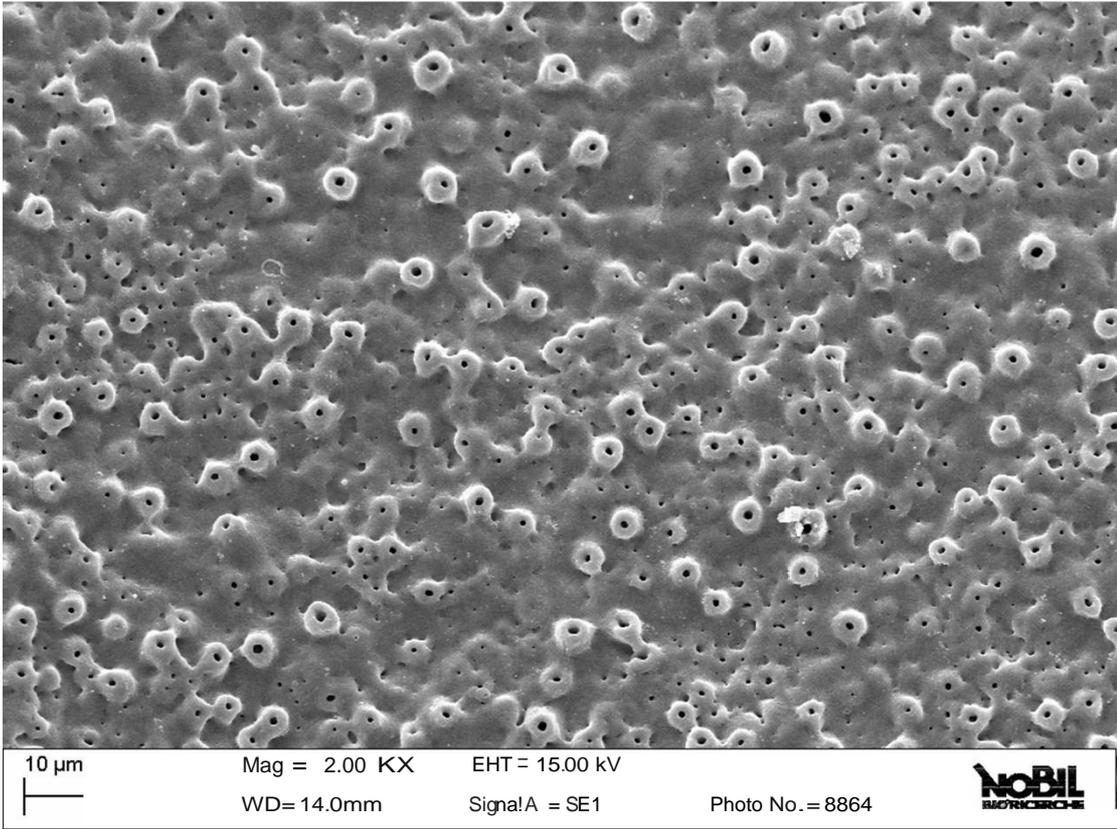
Le immagini ottenute mostrano che la superficie sabbiata degli impianti BRANE TU consente l'adesione, la colonizzazione e la vasta proliferazione di cellule SaOS-2 osteoblasti. Questo risultato suggerisce che la superficie dell'impianto è appropriata per dispositivi a contatto con l'osso e che non contiene contaminanti tossici o residui, che di certo non permetterebbero all'interazione cellula-superficie di procedere nel modo documentato dal presente lavoro.

IMPIANTO BRANE TU 5.0 X 15.0 mm Lotto 142  
Immagine delle cellule al microscopio ottico



**Adesione cellule SAOS-2**  
**IMPIANTO BRANE TU 5.0 X 15.0 mm**  
**Lotto 142**

IMPIANTO BRANE TU 5.0 X 15.0 mm Lotto 142  
SUPERFICIE SENZA CELLULE



# 6 ORE

Fig. 1

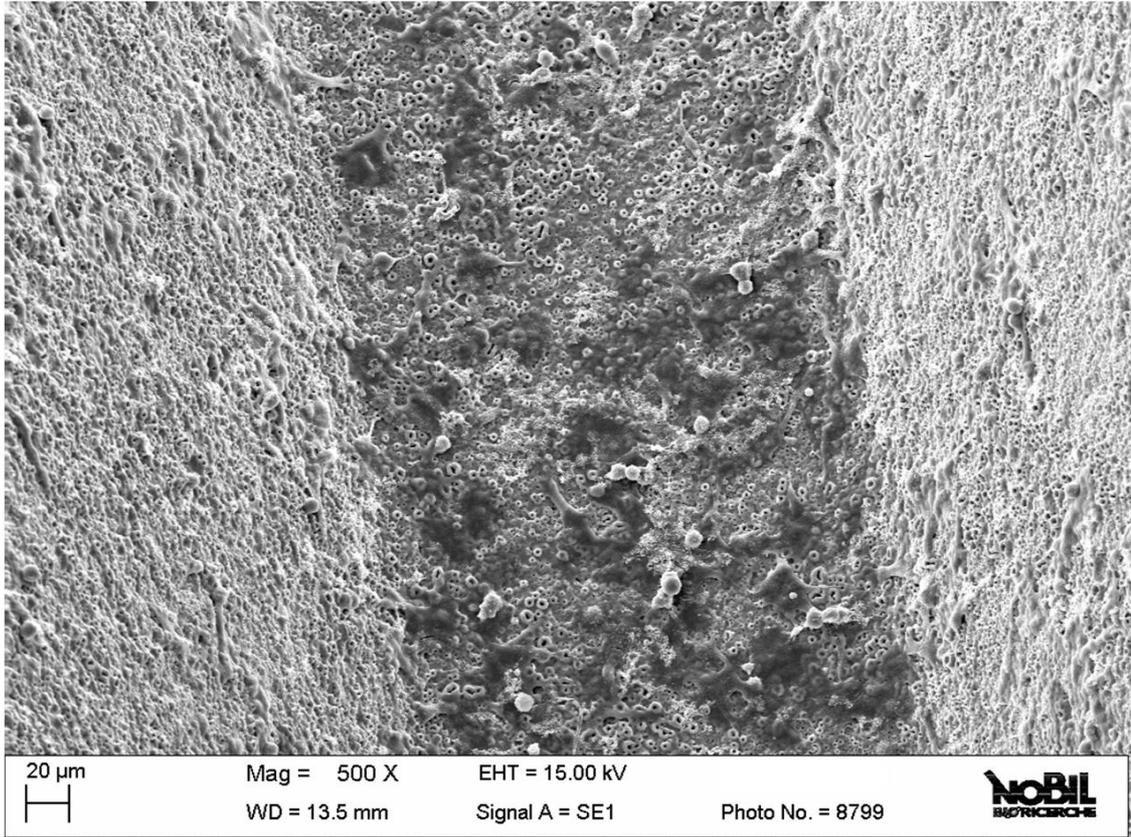


Fig. 2

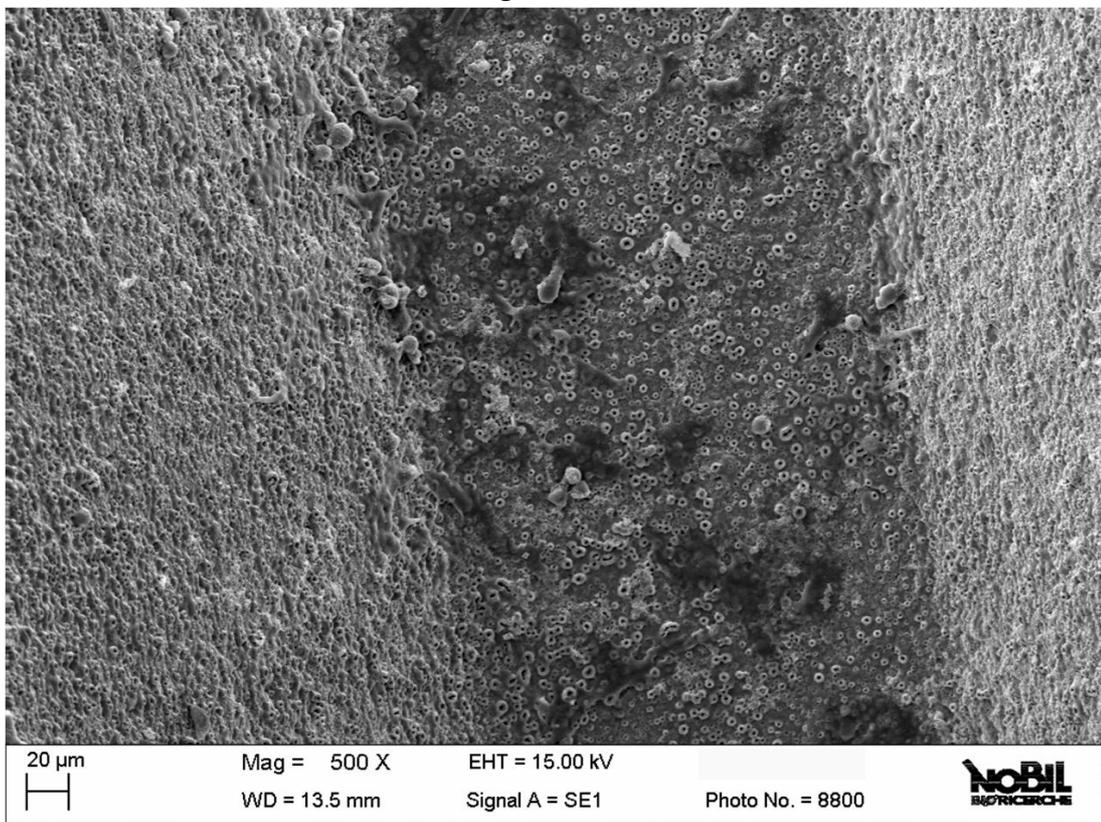


Fig. 3

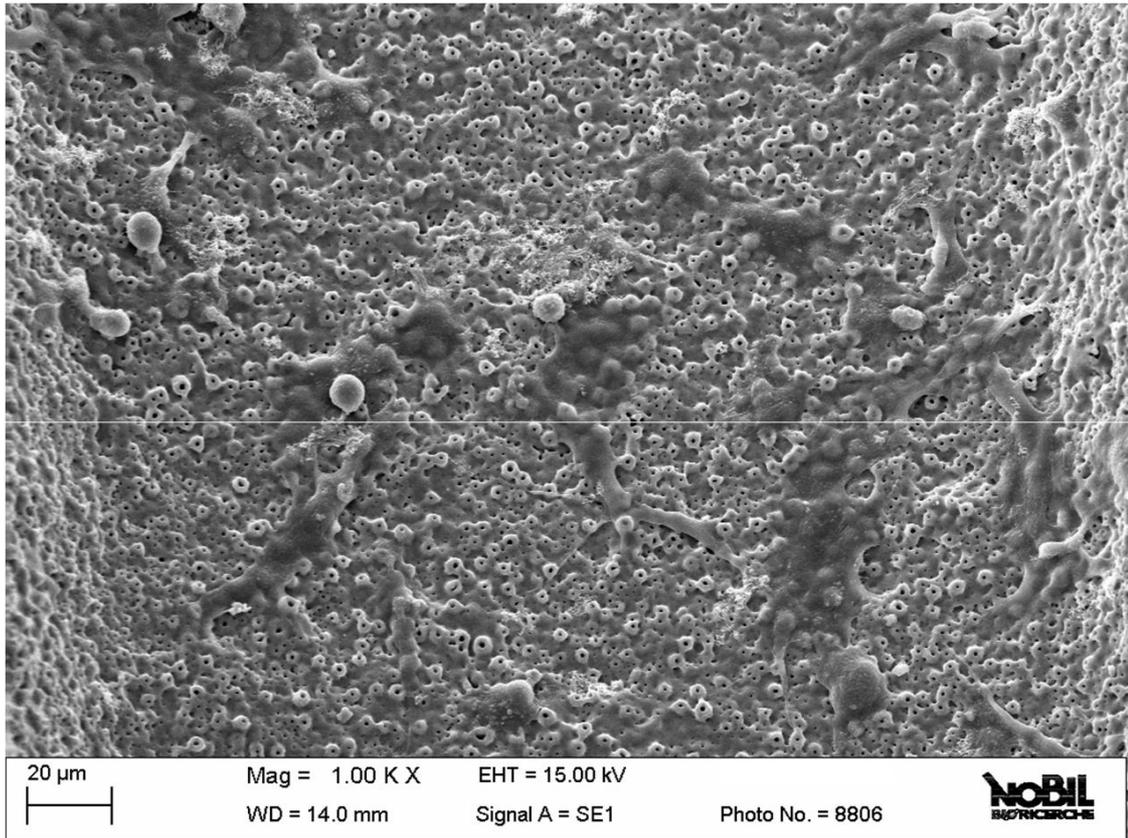


Fig. 4

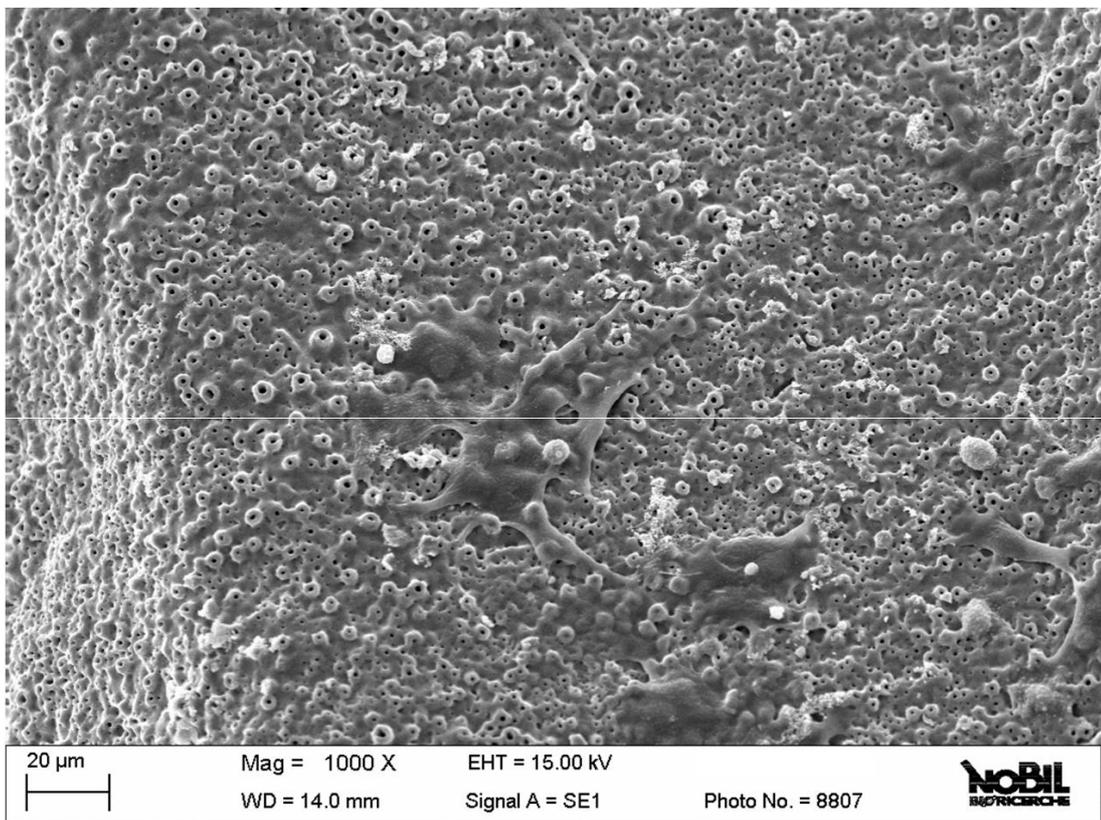


Fig. 5

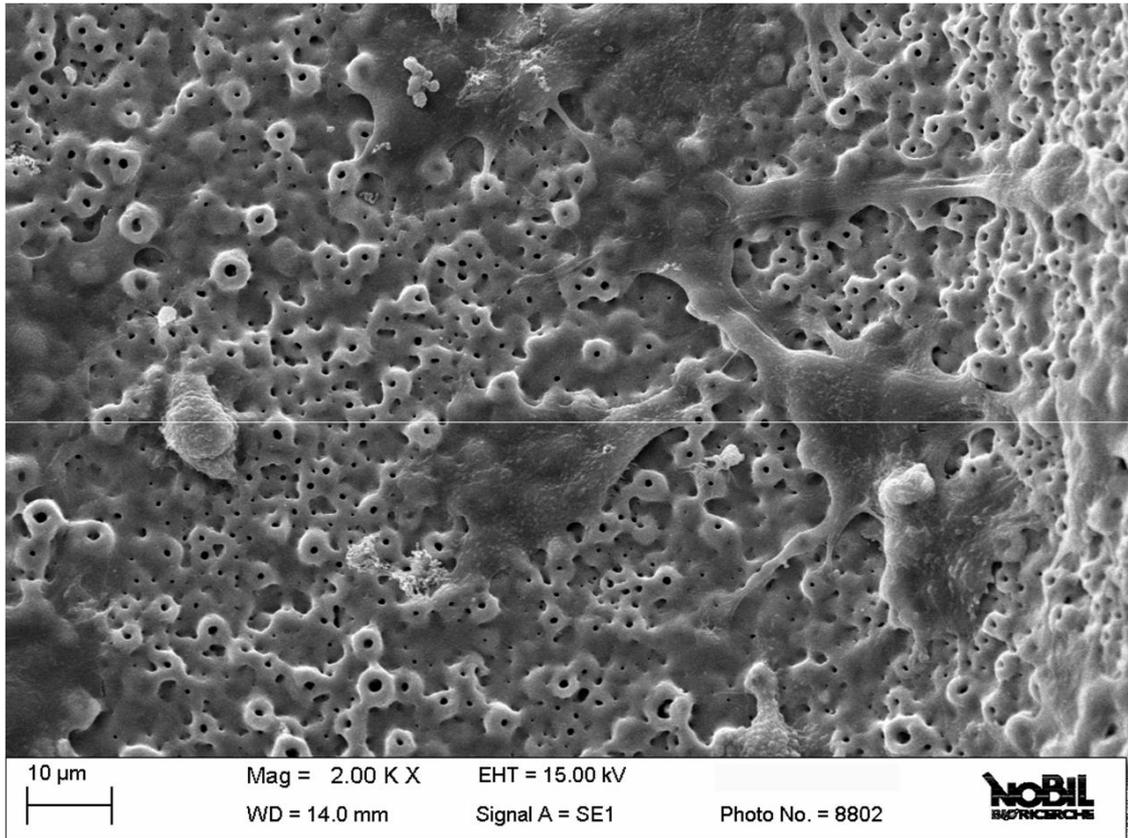


Fig. 6

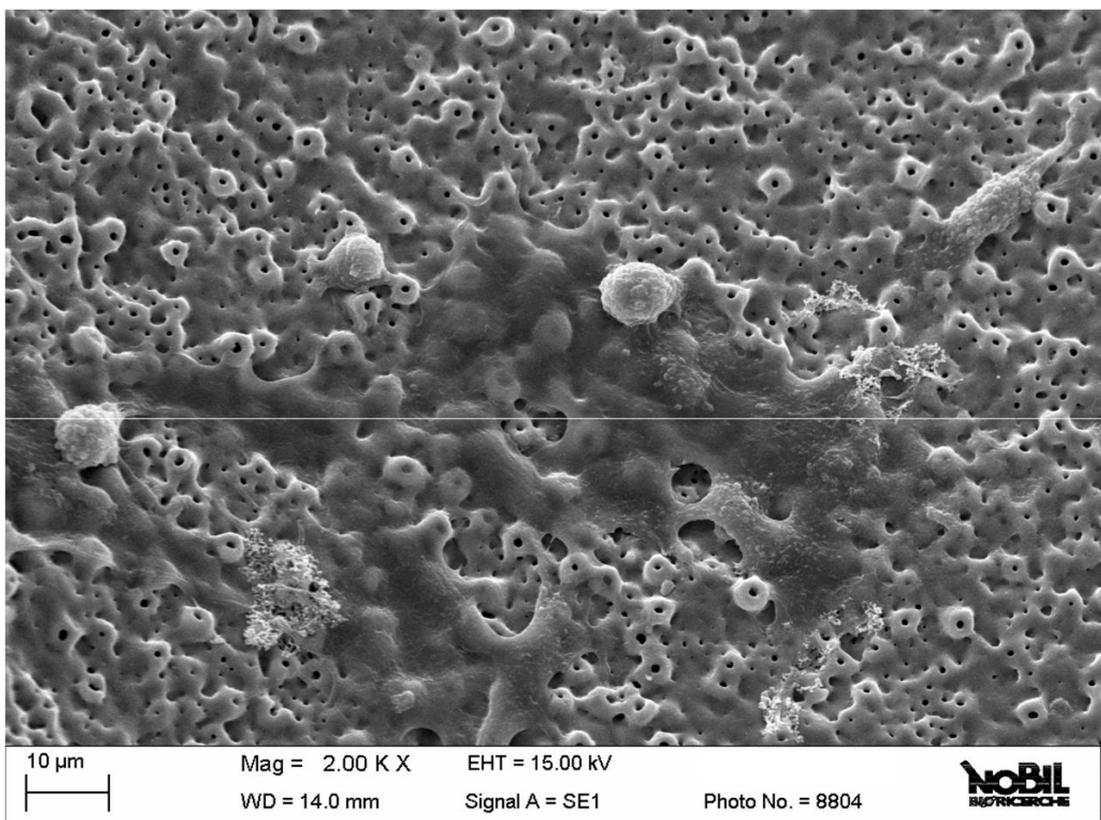


Fig. 7

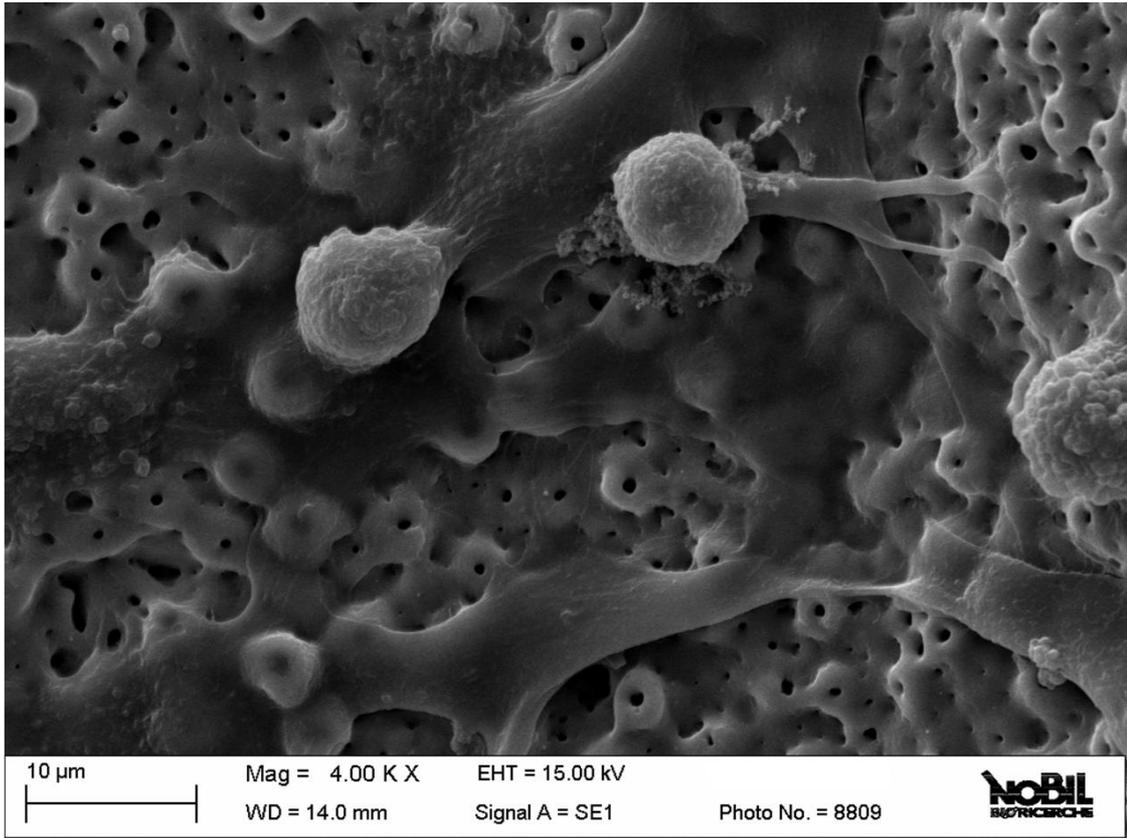


Fig. 8

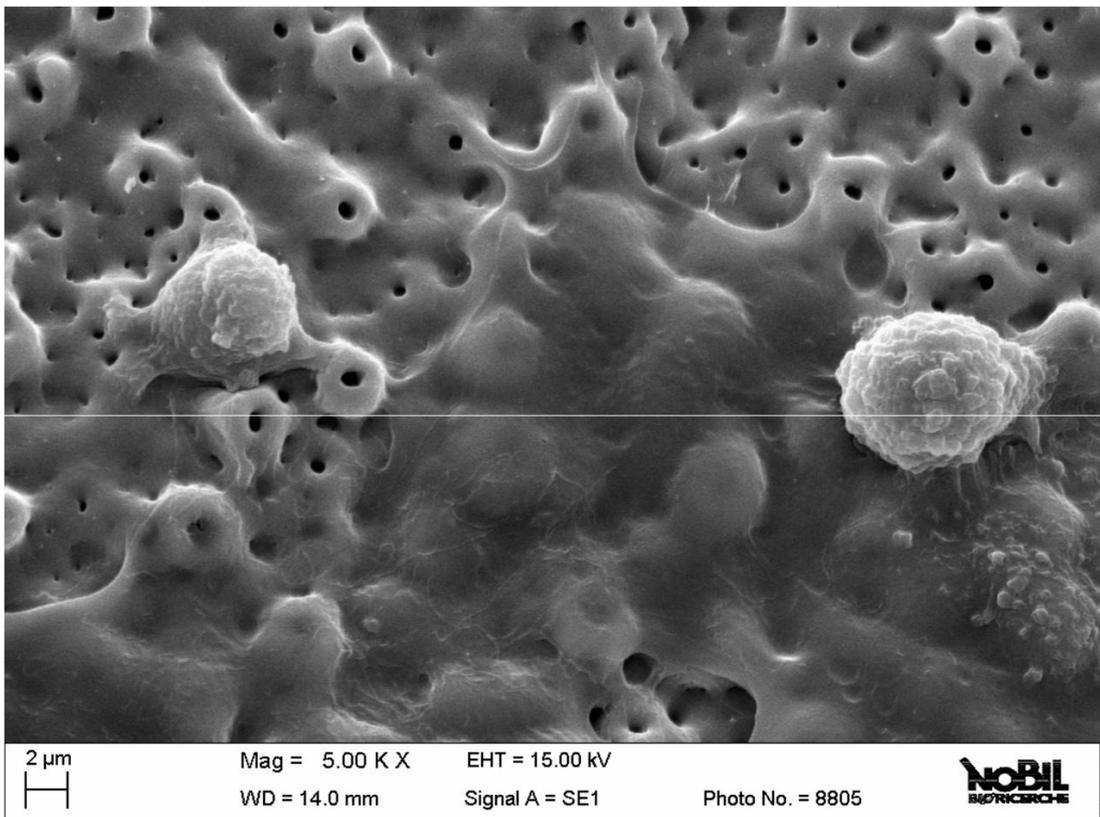


Fig. 9

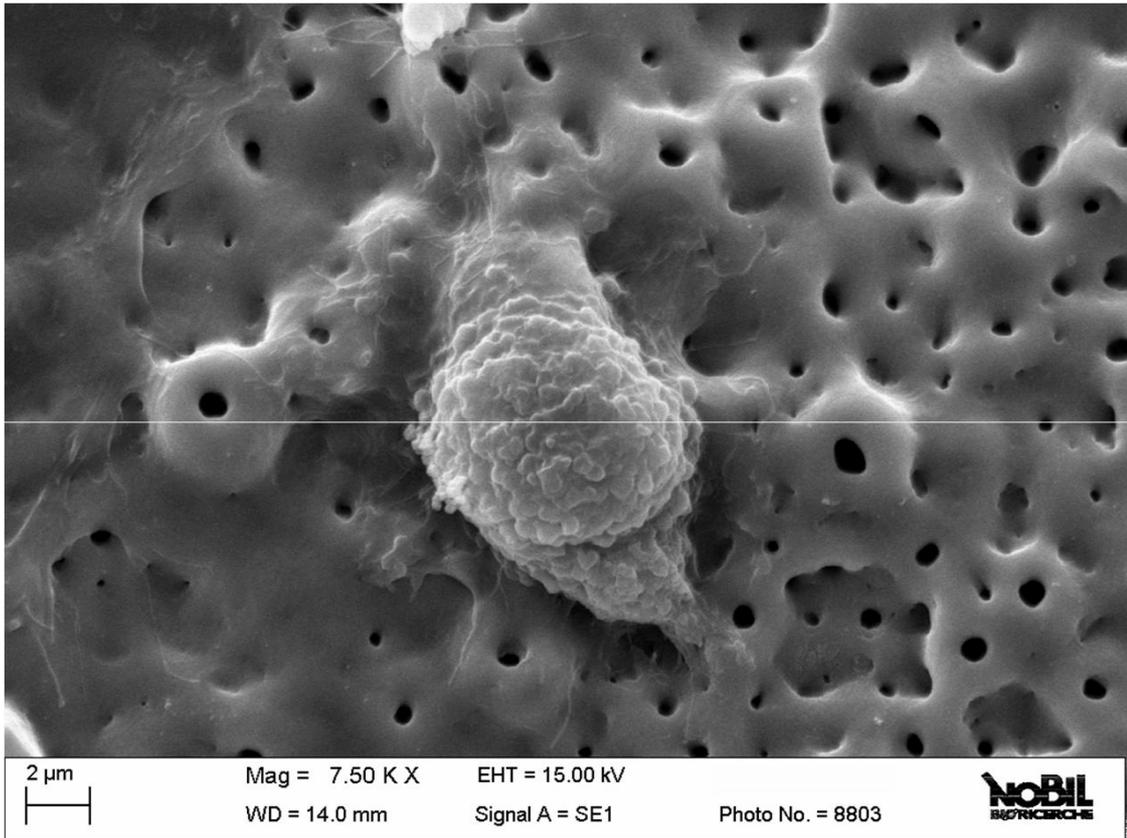


Fig. 10

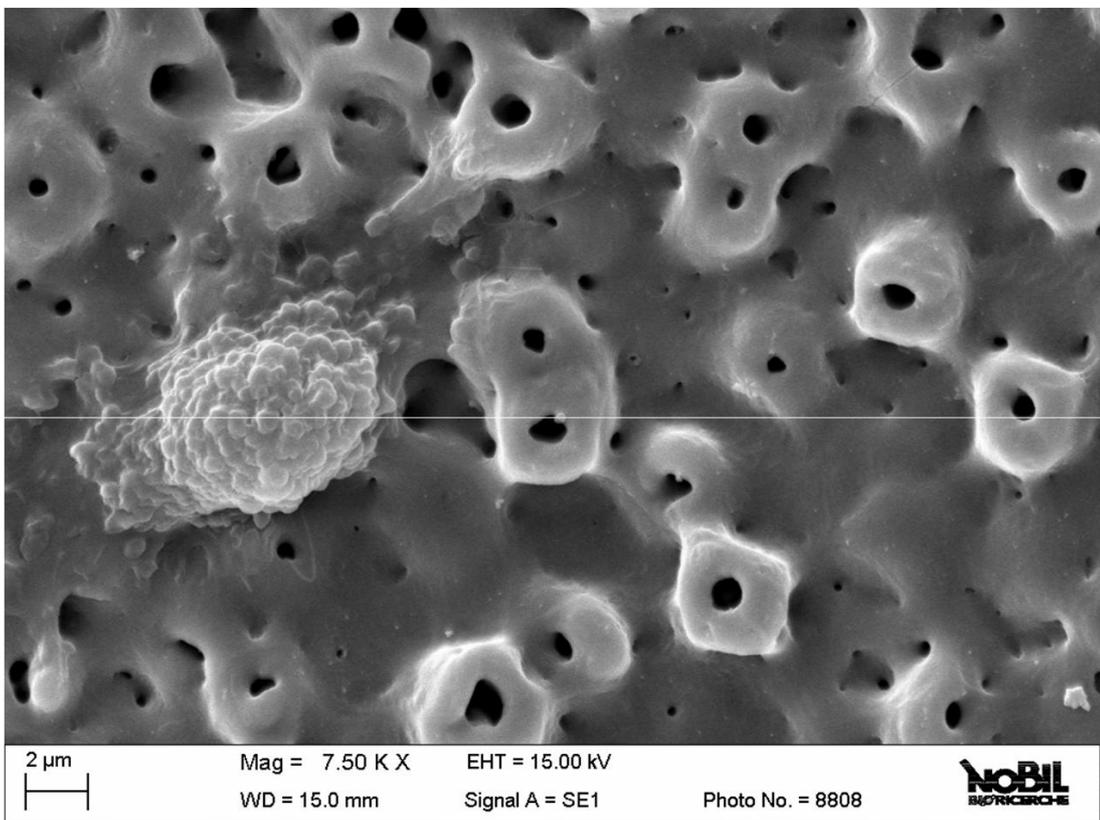


Fig. 11

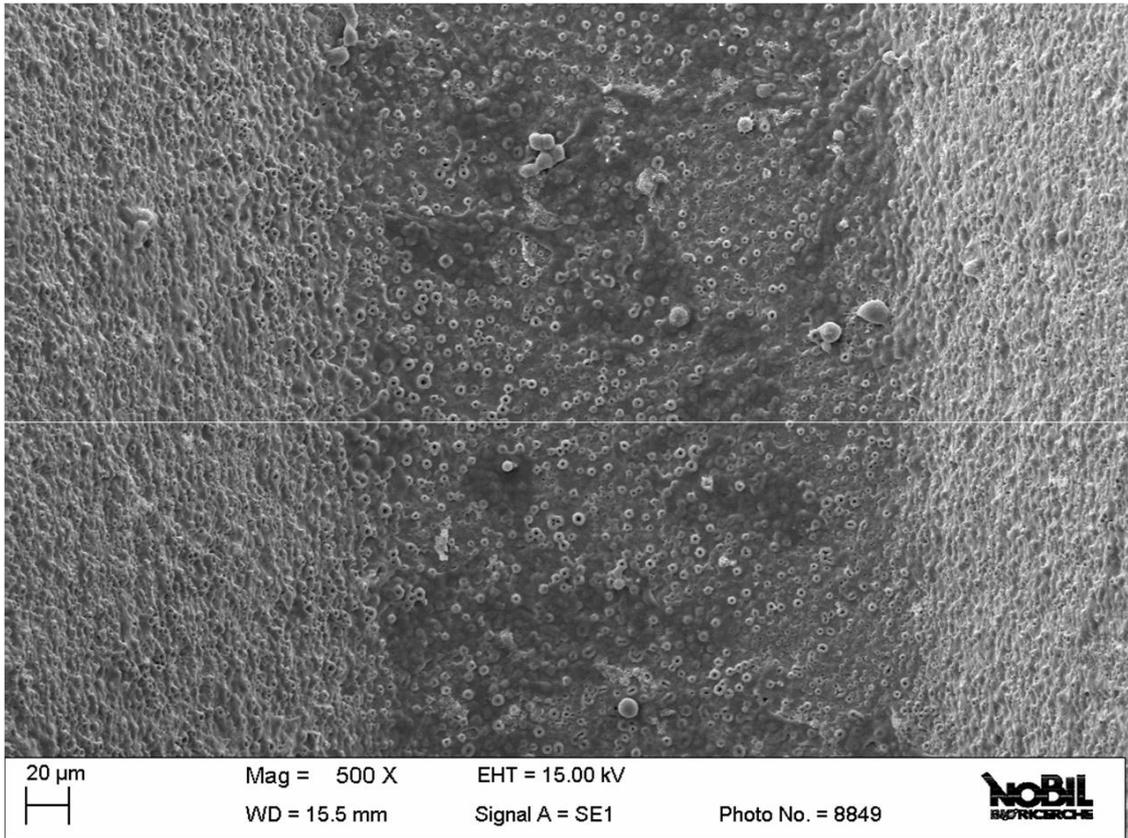


Fig. 12

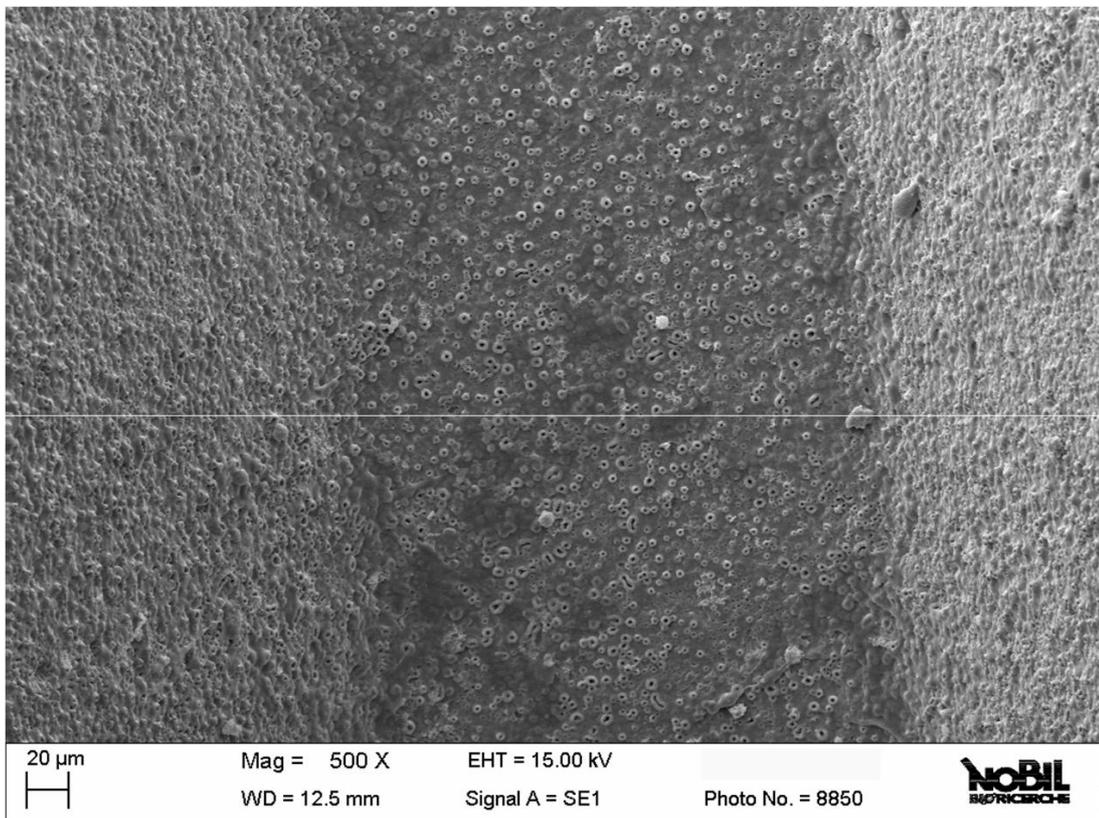


Fig. 13

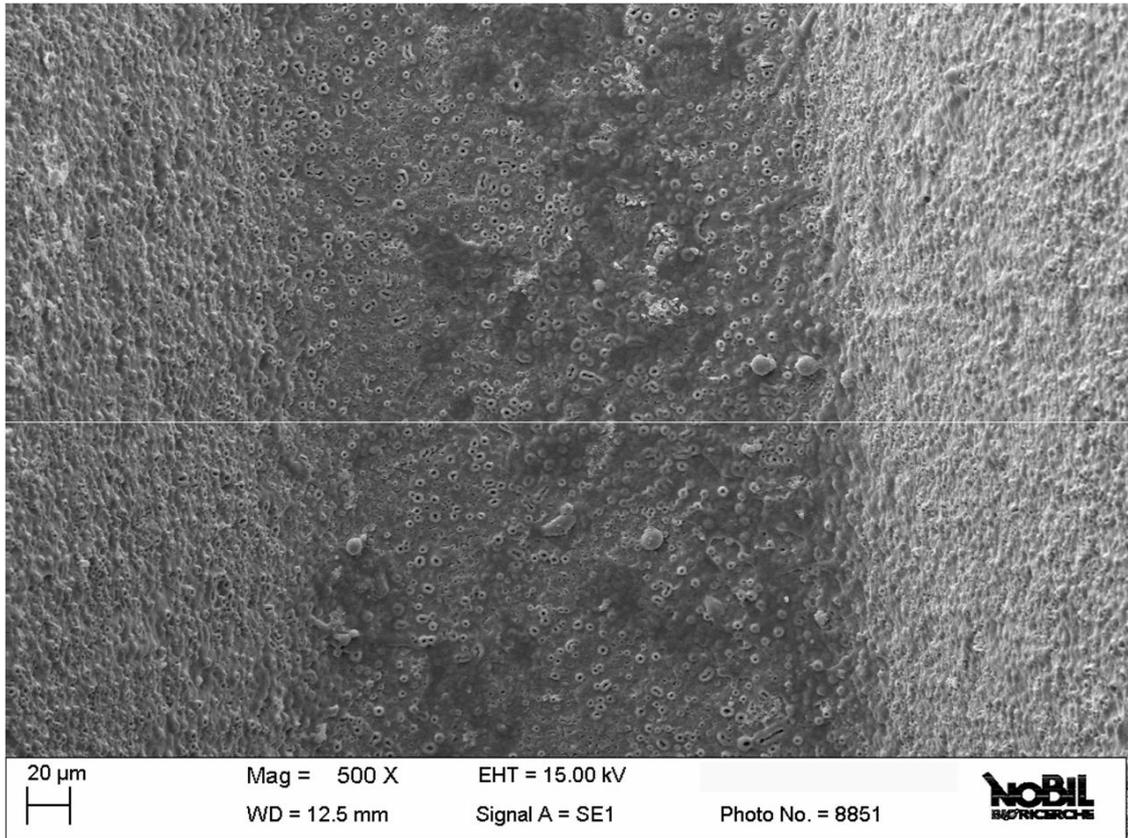


Fig. 14

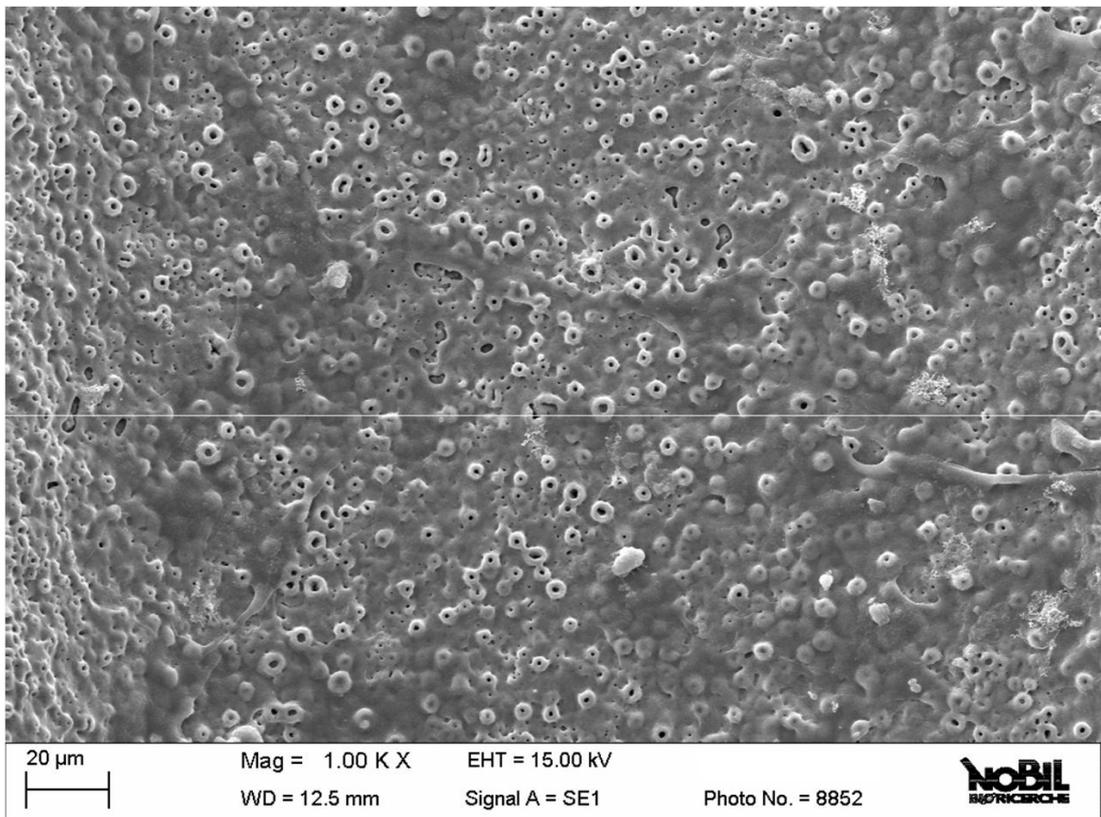


Fig. 15

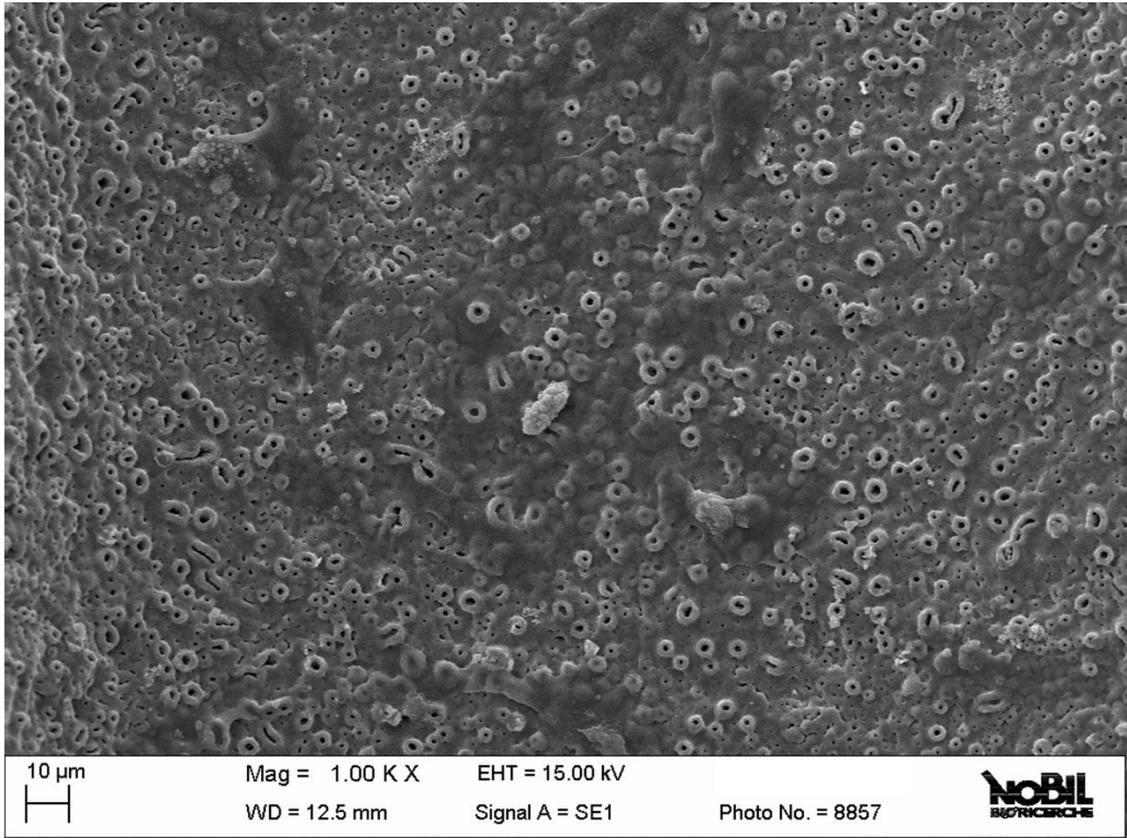


Fig. 16

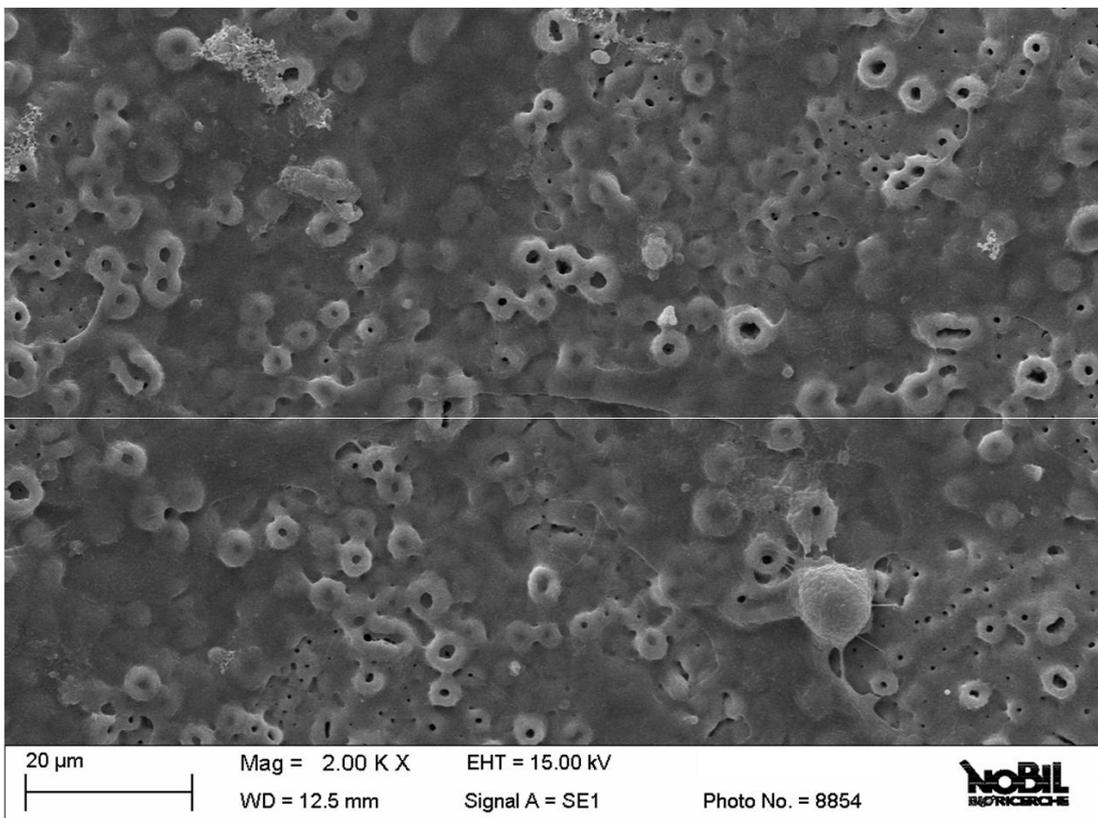


Fig. 17

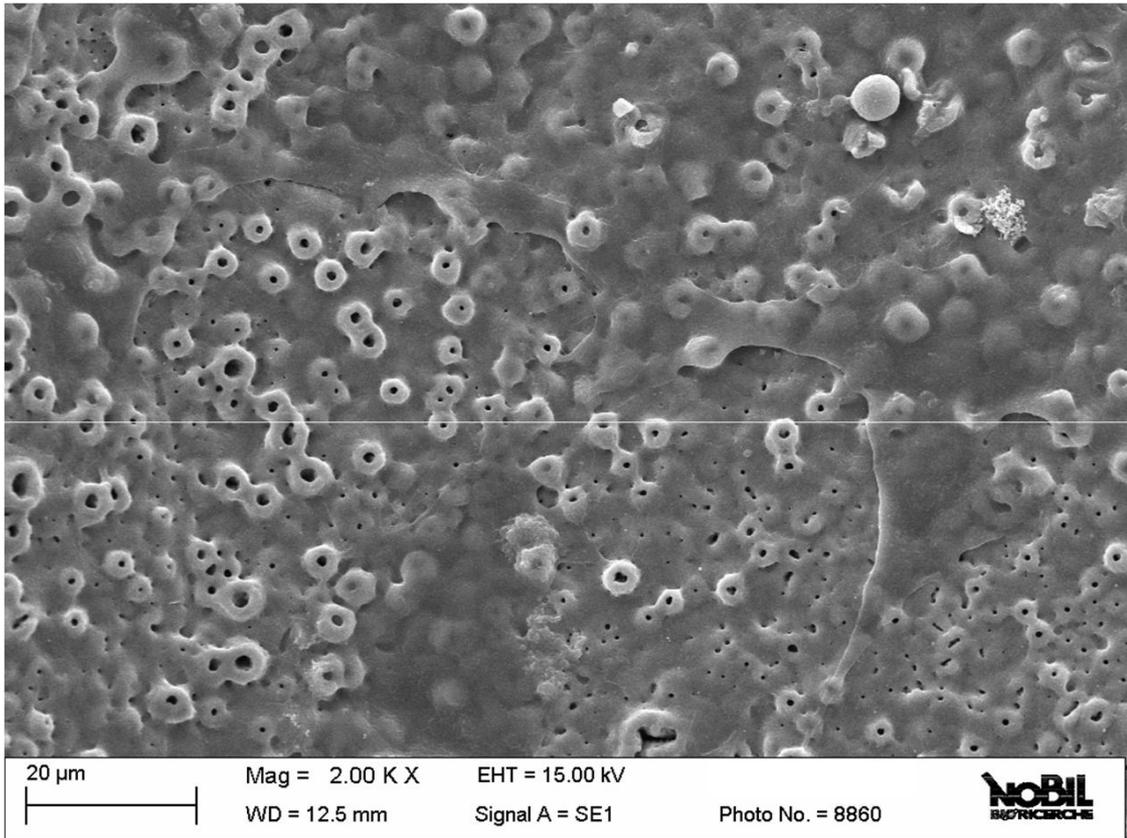
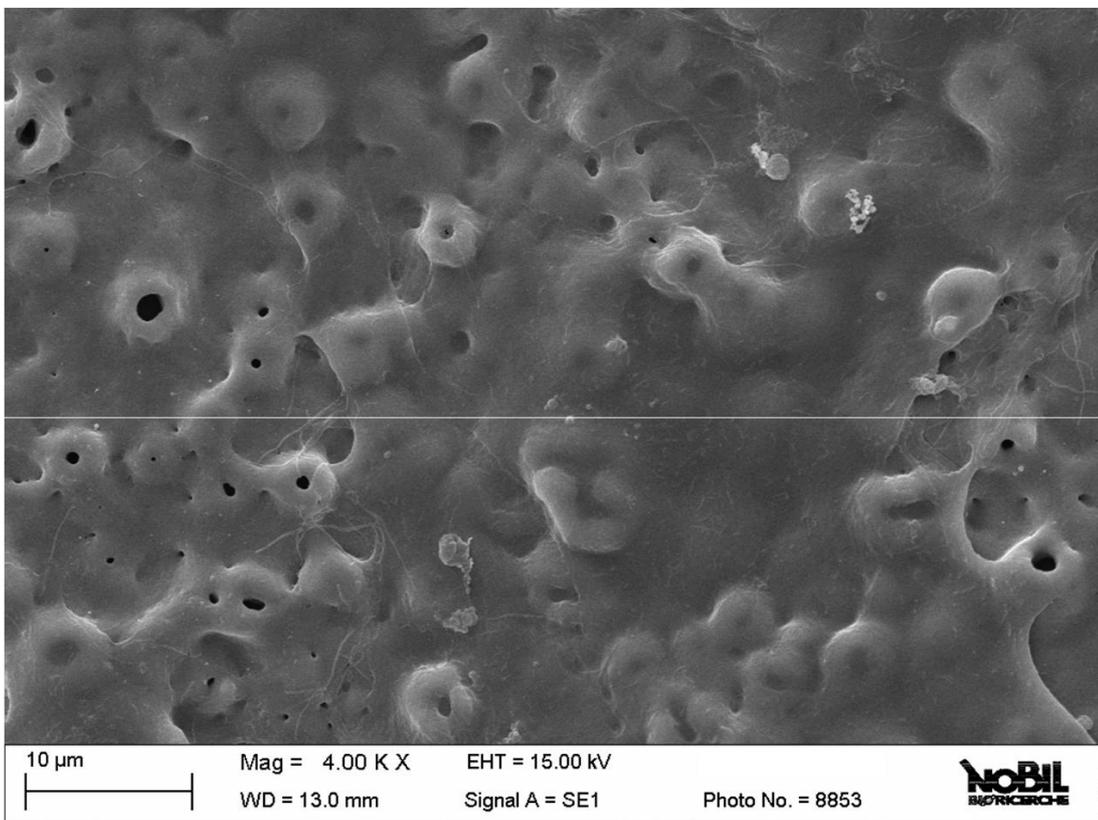


Fig. 18



240RE

Fig. 19

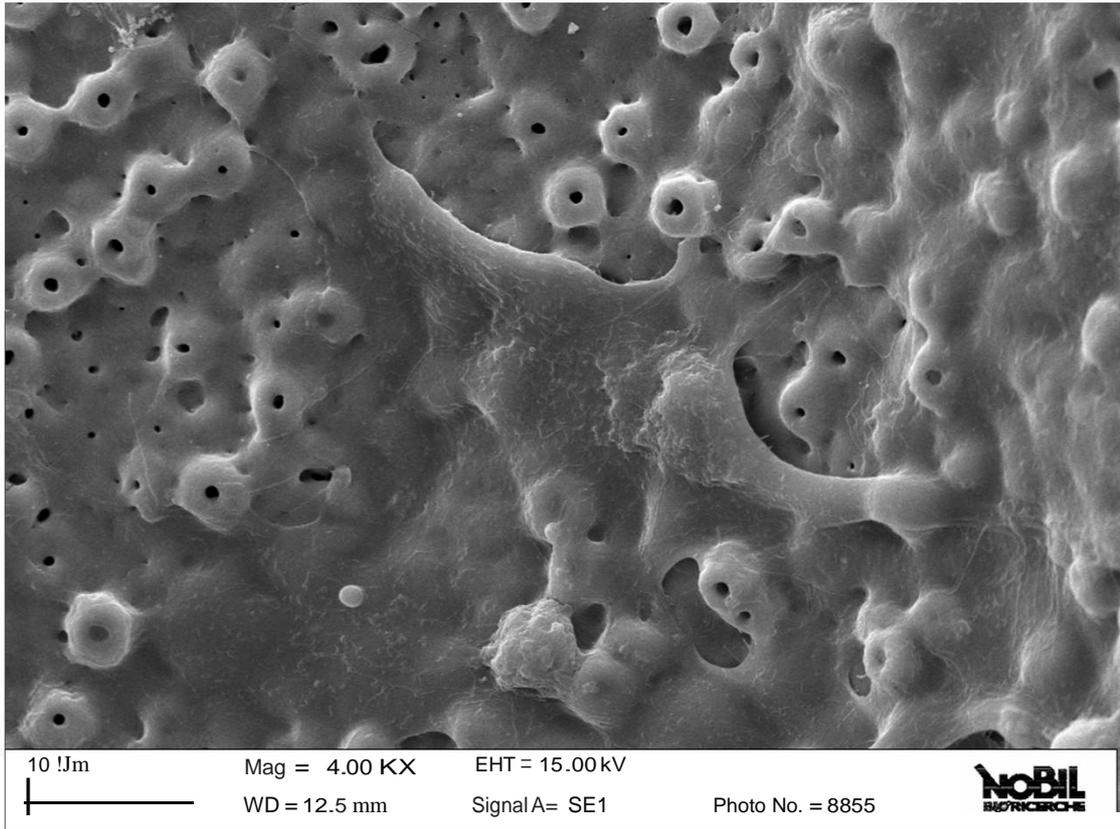


Fig. 20

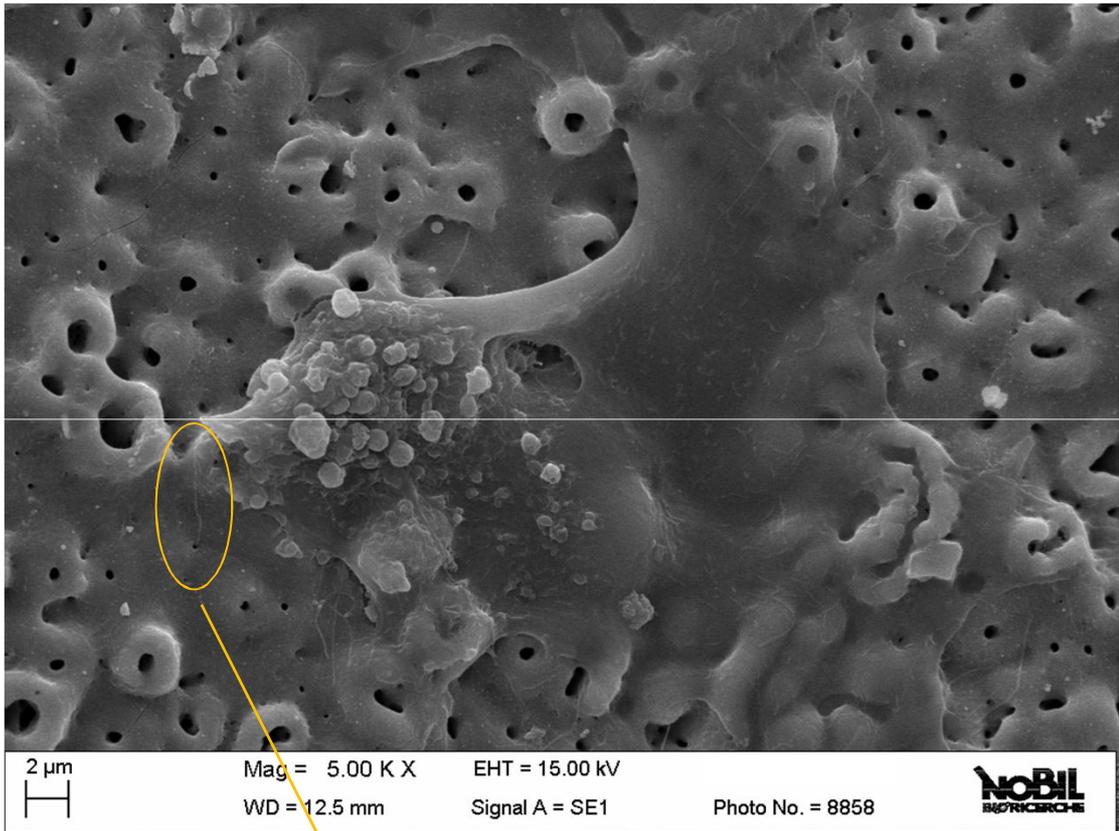


Fig. 21

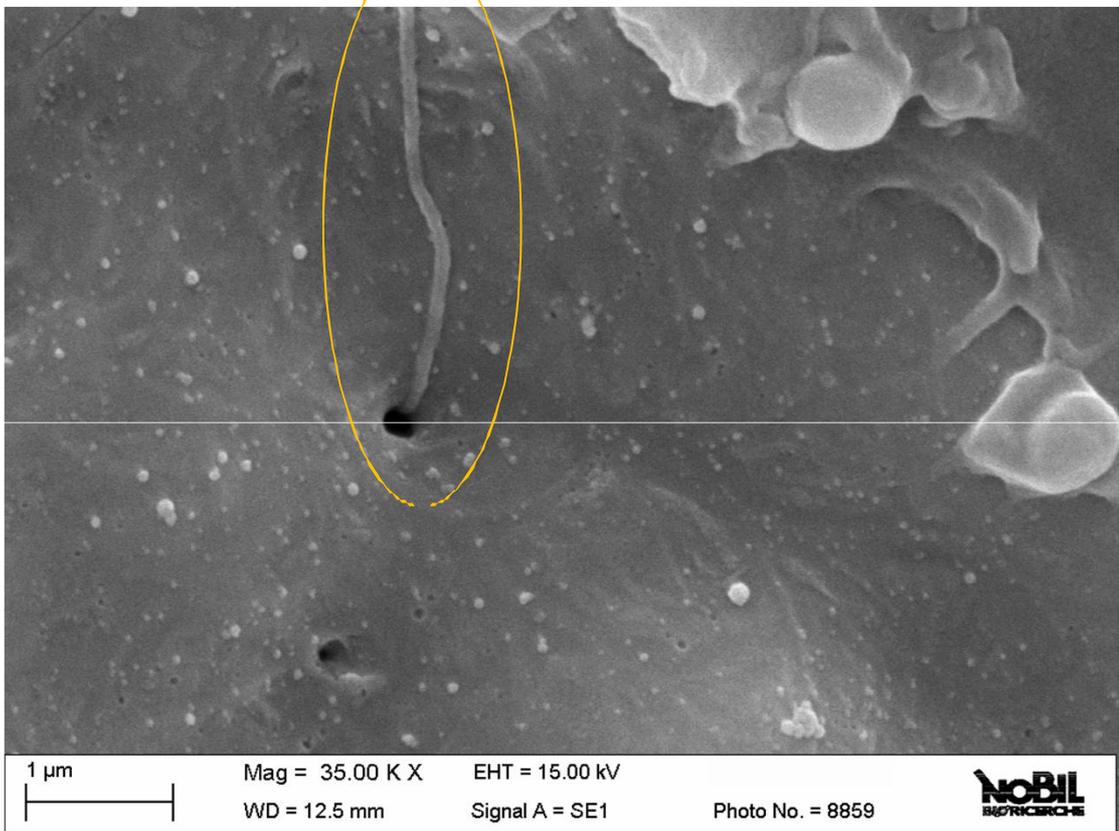


Fig. 22

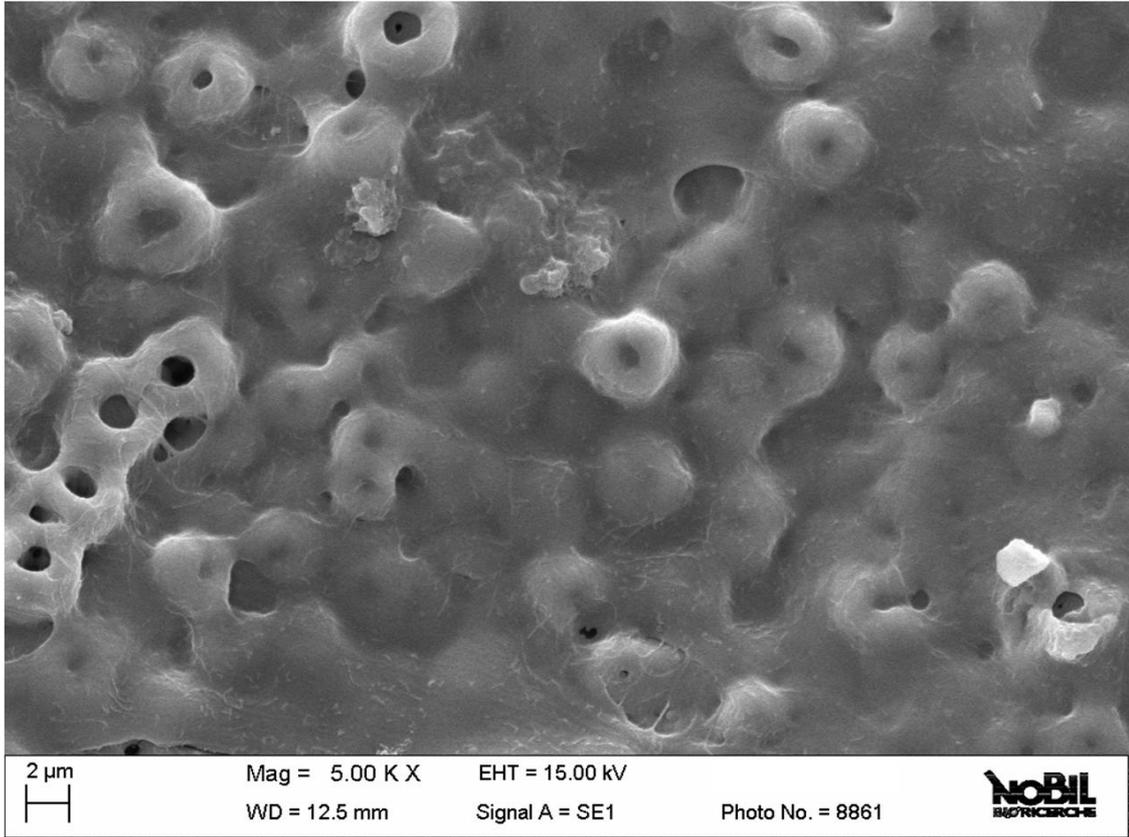


Fig. 23

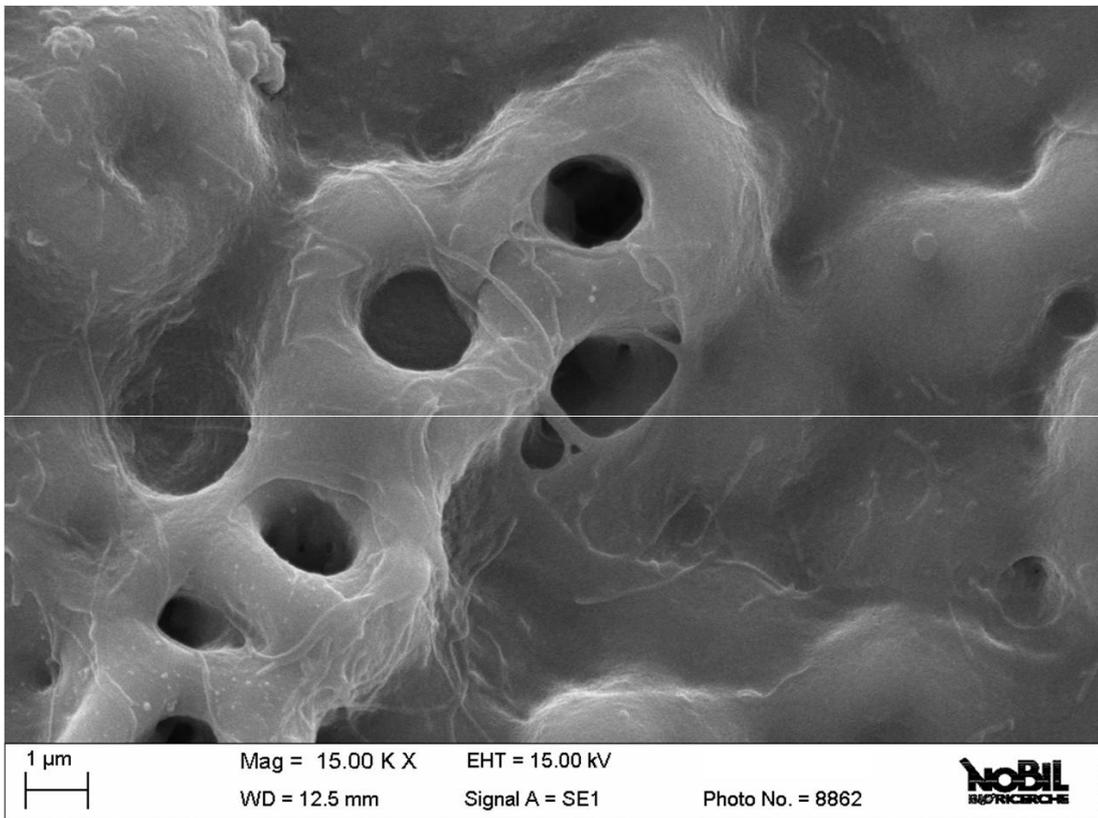


Fig. 24

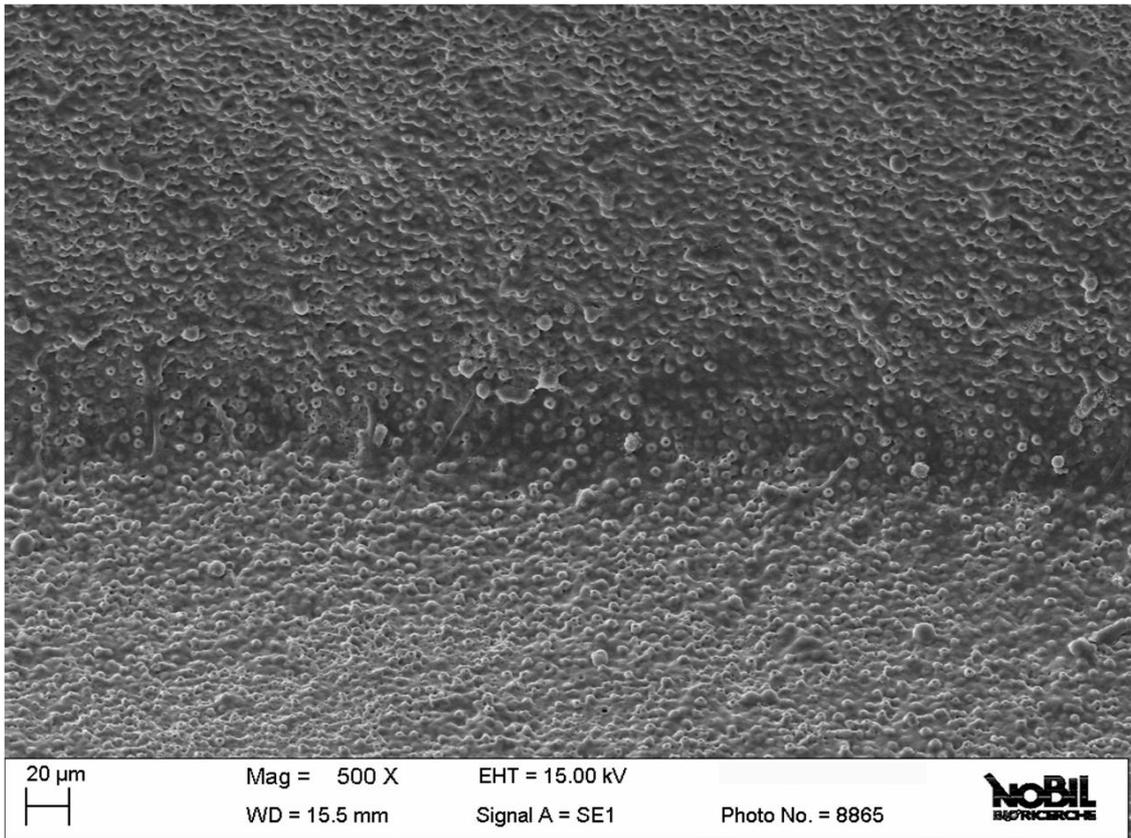


Fig. 25

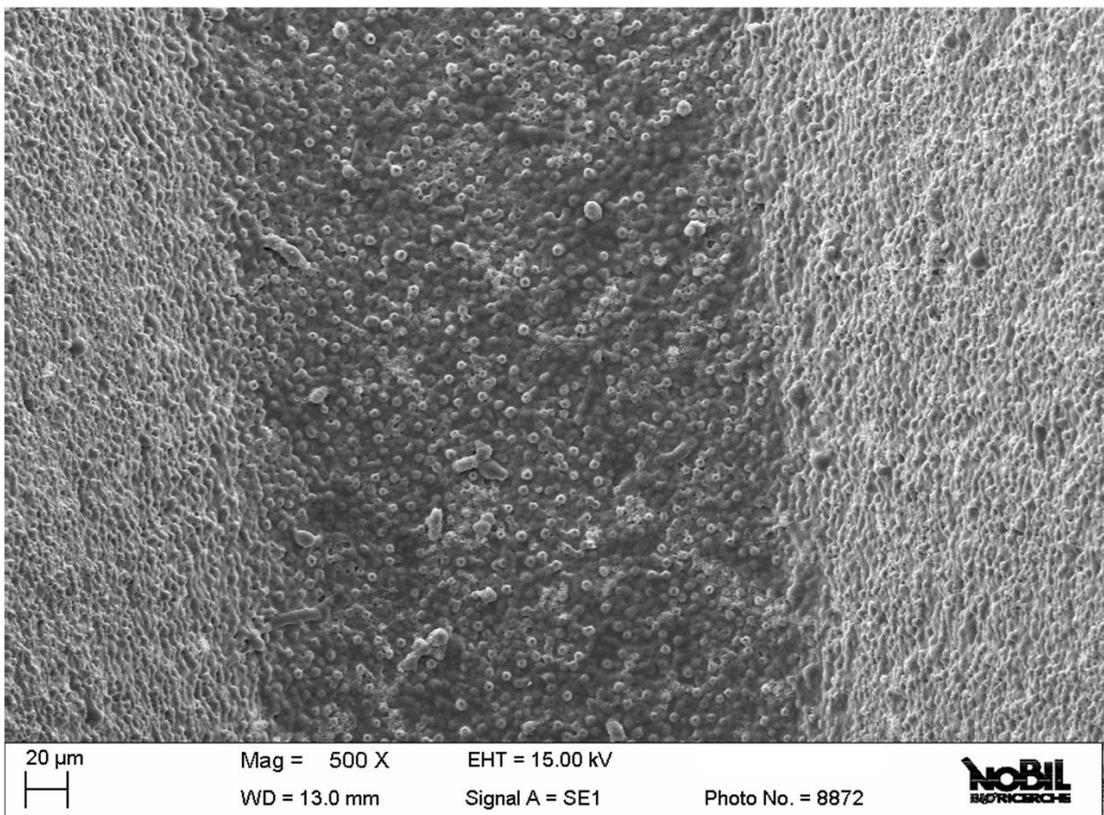


Fig. 26

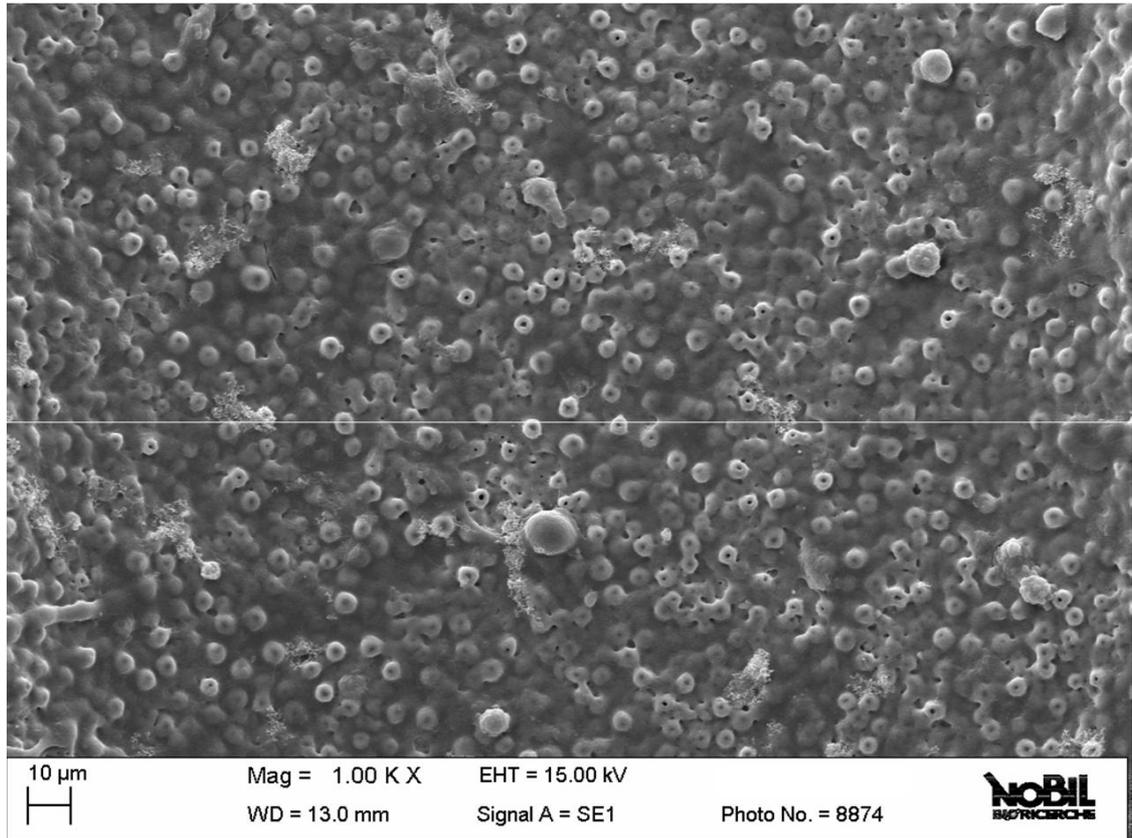


Fig. 27

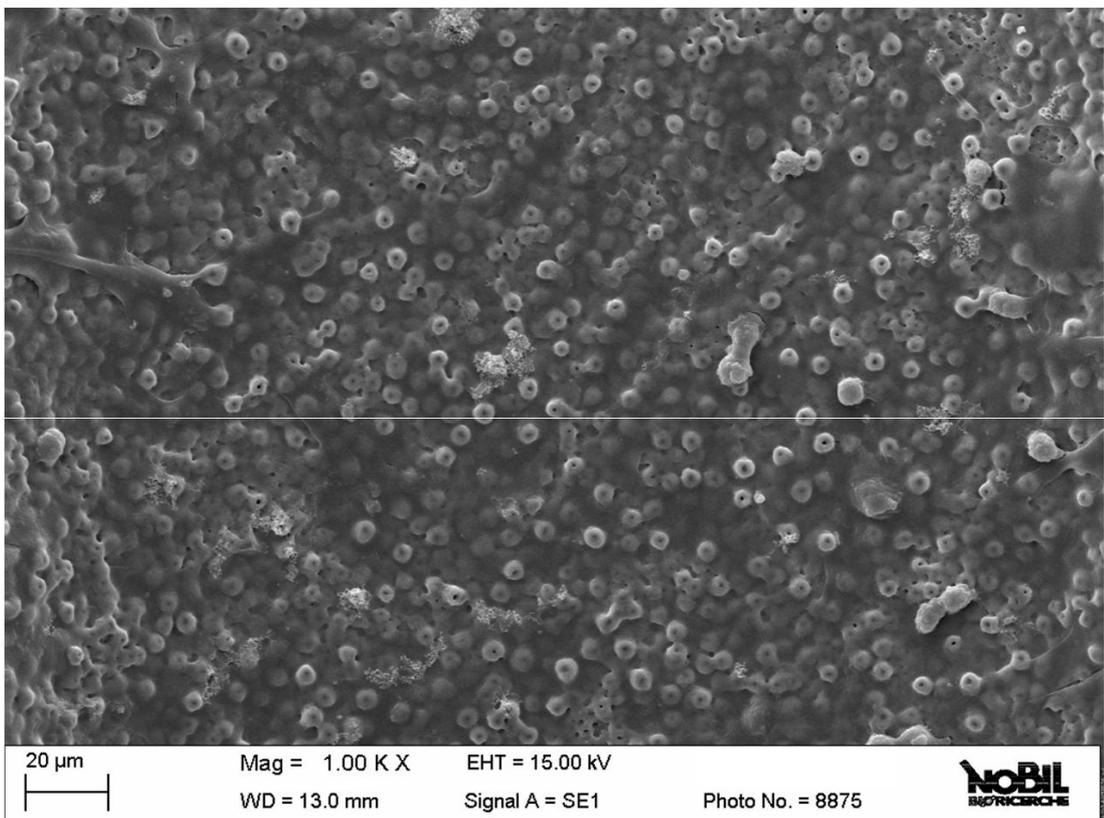


Fig. 28

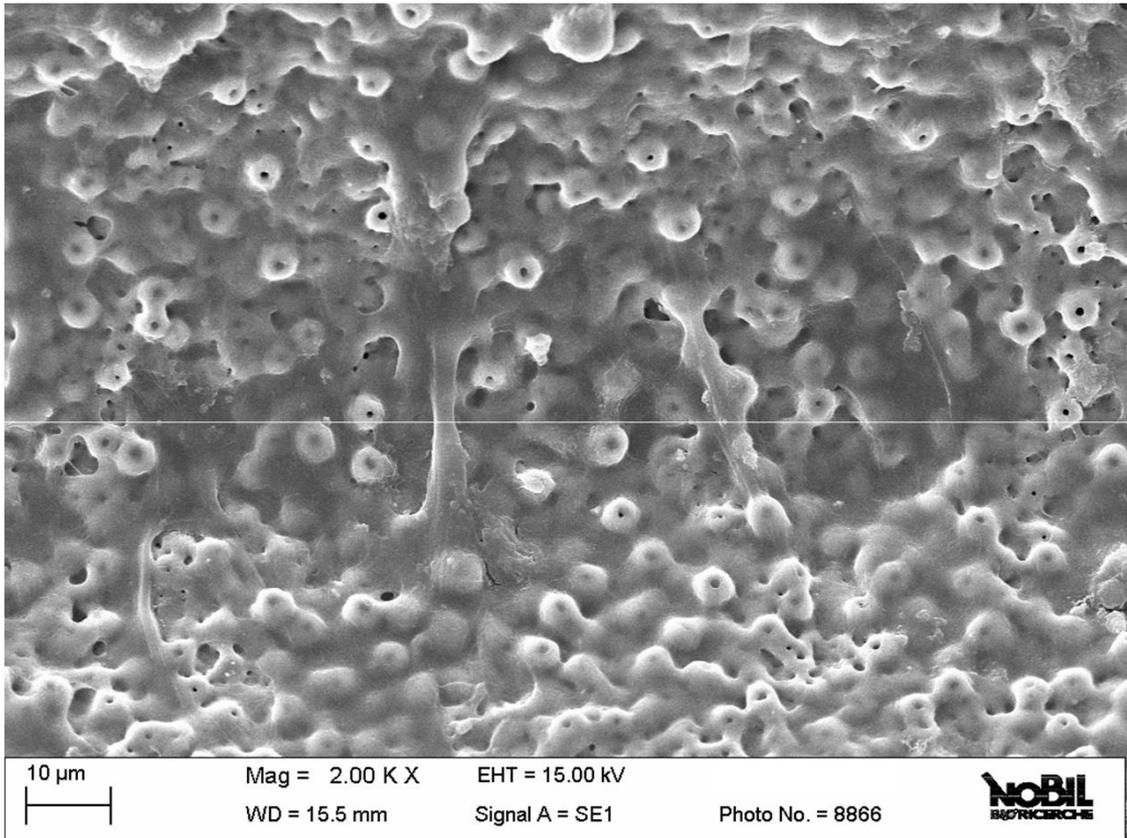


Fig. 29

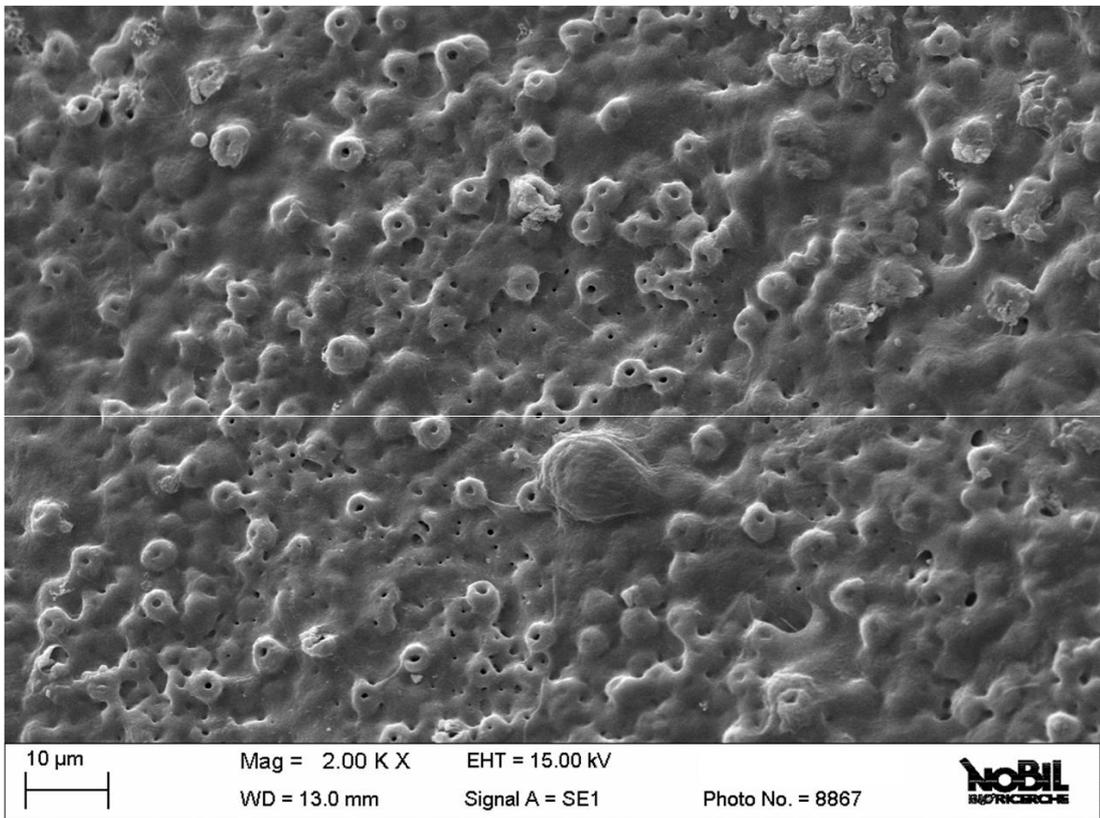


Fig. 30

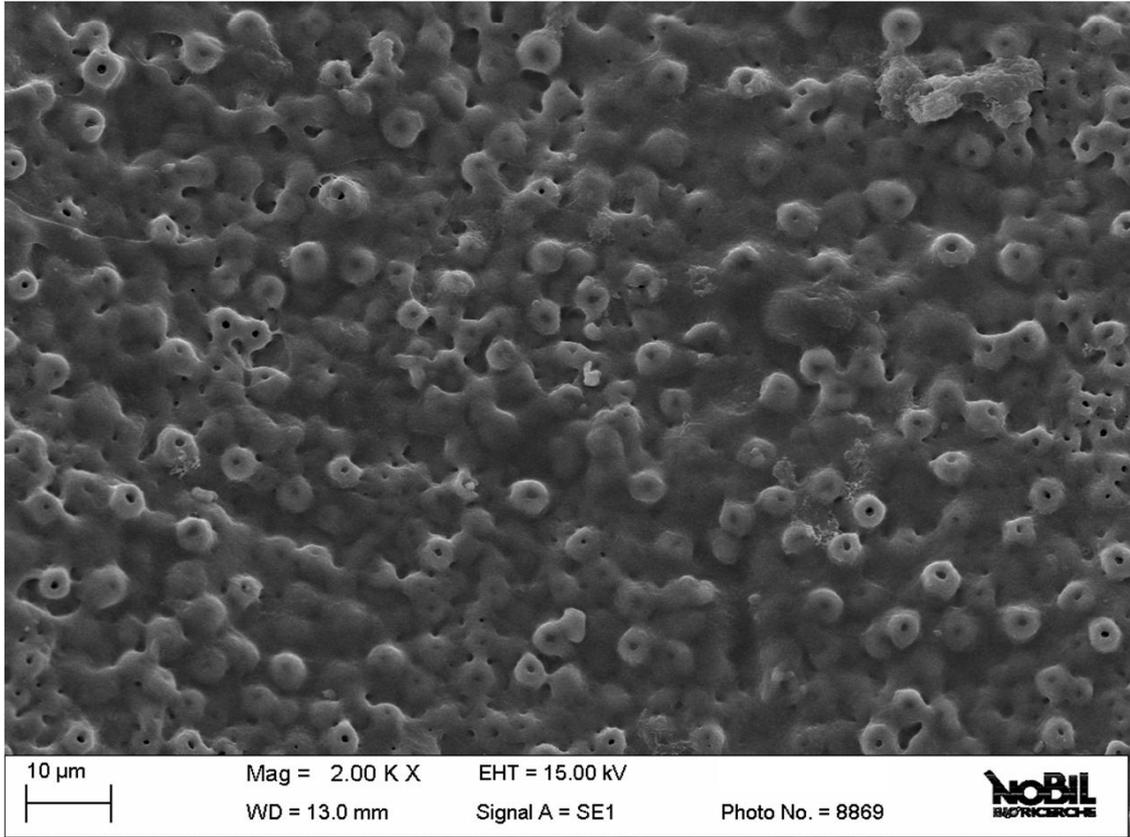


Fig. 31

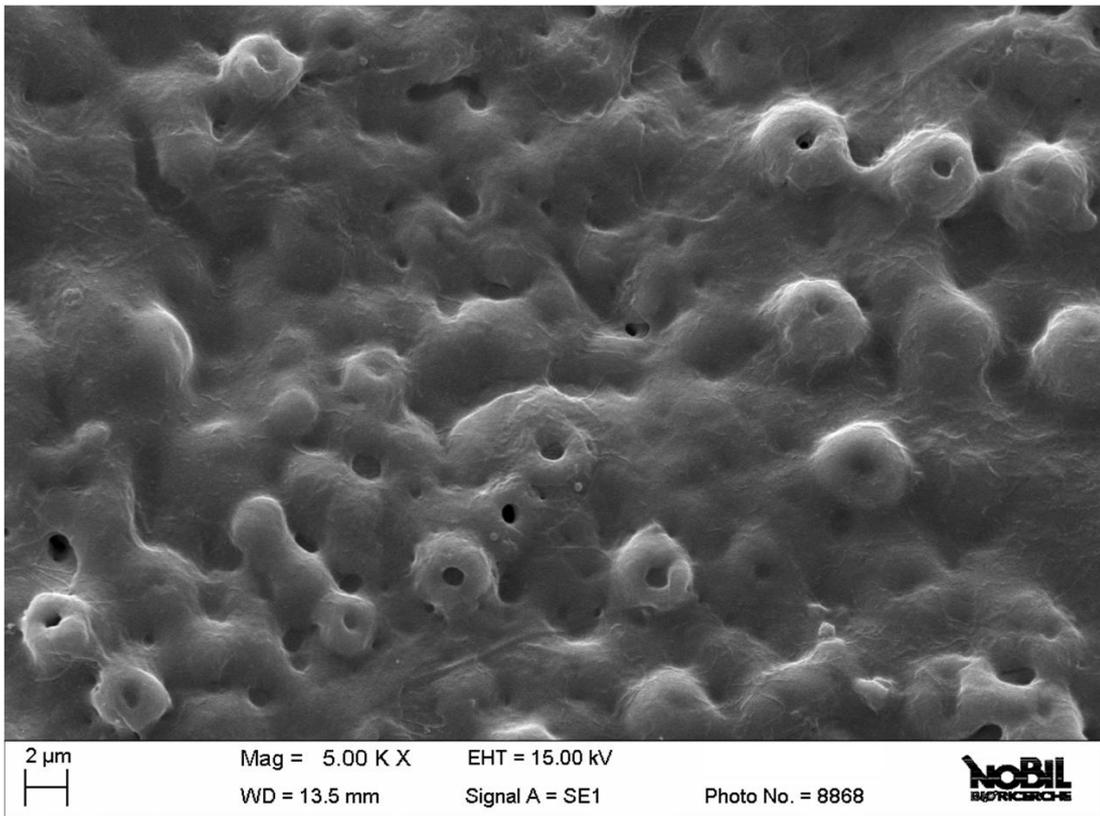


Fig. 32

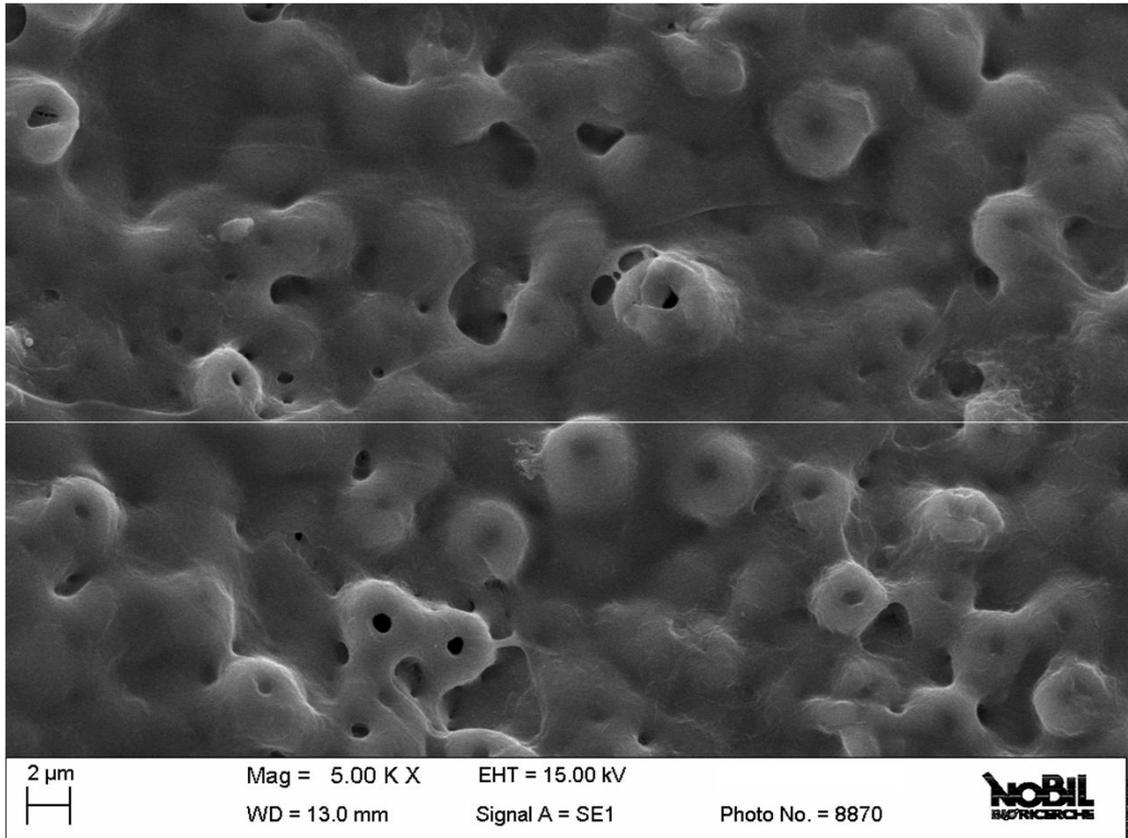
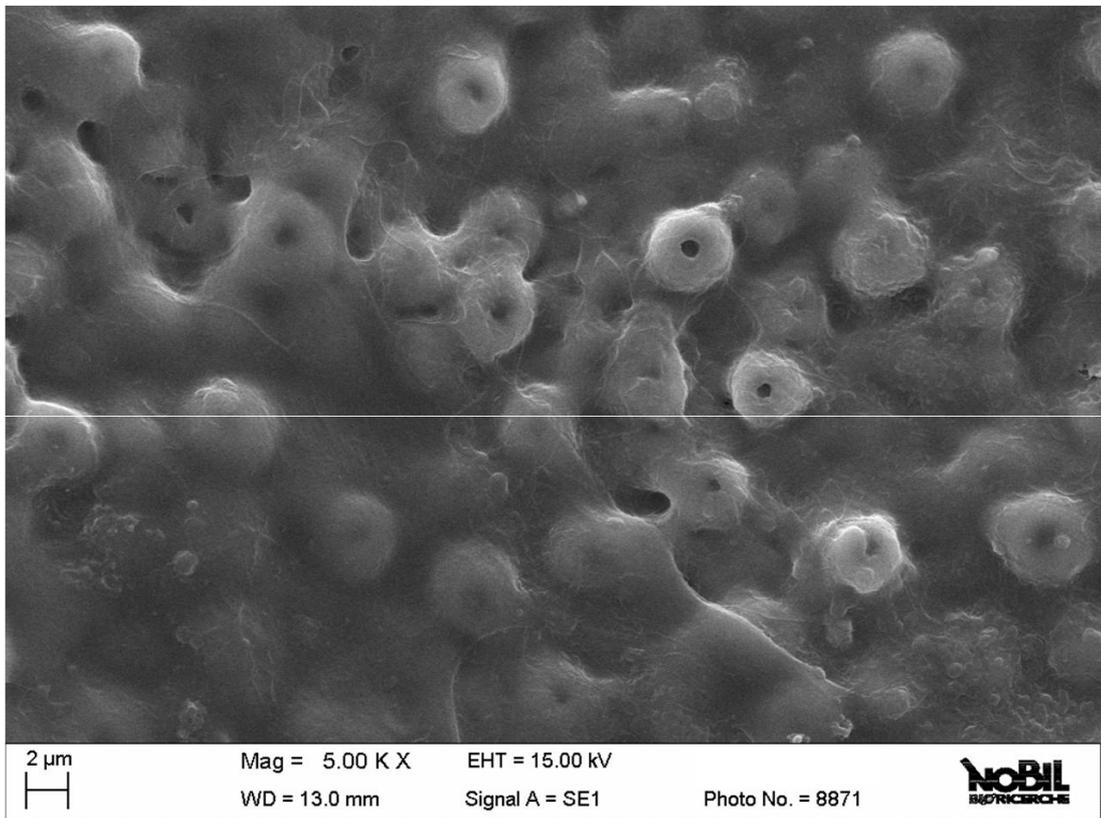


Fig. 33



720RE

Fig. 34

