



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

# Report di Adesione Cellulare su Impianti dentali Tecom

**Committente: Titanmed s.r.l.**



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

### **Scopo del lavoro:**

Lo scopo del lavoro consiste nello studio morfologico dell'adesione cellulare all'interfaccia con impianti dentali in titanio, 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 e porosità, influenza l'adesione, la Proliferazione e la differenziazione delle cellule: i dettagli strutturali e la morfologia delle cellule sono la risposta agli stimoli provenienti dal contatto cellula-superficie. Sulla base di queste considerazioni, è stata valutata l'adesione di precursori di osteoblasti murini (MC3T3), che rappresentano il modello migliore in questo campo d'applicazione, suffragato da una consistente letteratura scientifica. L'uso di tali cellule, infatti, deriva dalla consapevolezza che le varie linee derivanti da osteosarcomi (es. SaOS-2, MG-63, etc.) non costituiscono, proprio perchè neoplastiche, il migliore strumento per valutare il comportamento degli osteoblasti invitro. D'altronde anche le colture primarie, ossia cloni cellulari isolati ogni volta da tessuti di donatori opportuni, sono troppo soggette ad una grande variabilità individuale che poco risponde all'esigenza di garantire una soddisfacente riproducibilità sperimentale.

### **Materiali:**

Sono stati svolti test su un impianto fornito da Titanmed s.r.l., perfettamente confezionato e sterile. In particolare, come riportato nel documento di Accompagnamento ( n.2363 del 29/09/2014), è stato analizzato:

- IMPIANTO con Lotto 002523 CON TRATTAMENTO SUPERFICIALE DM TECOM IMPLANTOLOGY



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

### **Metodi:**

Le cellule usate per i test d'adesione sono precursori di osteoblasti murini MC3T3-E1, acquistate dalla "European Collection of Cell Cultures". I test di adesione cellulare sono stati condotti in accordo con i protocolli elencati nella letteratura internazionale.

Le cellule MC3T3-E1 vengono piastrate ad una densità di 150.000 cell/well su un multiwell da 12 pozzetti (12-well, Corning) contenente l'impianto fornito oggetto di test (prelevato e posizionato all'intero dei pozzetti in condizioni di sterilità). Le cellule vengono quindi poste nelle adeguate condizioni di coltura che consistono nella stabulazione in incubatore a 37°C con 5%CO<sub>2</sub> utilizzando l'appropriato mezzo di coltura cellulare, MEM  $\alpha$  + 2mM Glutamine + 10% Foetal Bovine Serum (Sigma-AldrichCo.LLC.).

Tutte le manipolazioni vengono eseguite sotto cappa sterile a flusso laminare verticale in apposita camera colture cellulare certificata di livello biosicurezza 2.

Dopo 24 ore dalla piastratura l'impianto oggetto di test viene prelevato, lavato in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Gibco, INVITROGEN Srl) e fissato in Soluzione 4% Paraformaldehyde in DPBS. Dopo 3 lavaggi in DPBS le cellule vengono permeabilizzate in una soluzione di 0,1% Triton X100 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) in DPBS. Vengono quindi lavate 3 volte in DPBS.

Successivamente le cellule vengono marcate utilizzando Rhodamine phalloidin (Life Technologies) al fine di rendere fluorescente il citoscheletro (marcandolo in rosso). Vengono quindi lavate 3 volte in DPBS.

Successivamente le cellule vengono marcate utilizzando DAPI (Life Technologies) al fine di rendere fluorescenti i nuclei (marcandoli in blu). Vengono quindi lavate 3 volte in DPBS.

L'impianto con le cellule fissate viene portato ad un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse Ti-E dove sono acquisite immagini in Fluorescenza delle cellule adese sull'impianto. Le immagini vengono quindi processate per unire i diversi canali di fluorescenza e rendere apprezzabili tutti i dettagli morfologici considerati al fine di studiare l'adesione cellulare su queste superfici.



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

### **Risultati:**

La scelta strategica di marcare e analizzare l'actina (un componente citoscheletro cellulare) è risultata vincente. Il citoscheletro l'impalcatura delle cellule ed è responsabile del movimento e dell'adesione sulle superfici.

Questo ci ha permesso di valutare con grande sensibilità la morfologia cellulare e la disposizione di filopodi, lamellipodi ed in generale lo spreading. Questi risultano essere un ottimo criterio per valutare il "benessere" cellulare sulle superfici e quanto queste superfici siano adeguate a supportare un appropriata crescita e sviluppo cellulare.

Le superfici dell'impianto analizzato risulta ottimale per permettere un'ottima osteointegrazione dell'impianto, in quanto è possibile apprezzare, dalle immagini rappresentative ottenute e dalla valutazione fatta dall'operatore in sede di analisi, l'uniformità della crescita e dell'adesione cellulare su tutto l'impianto (escludendo quindi la presenza di zone e aree con difetti qualitativi).

Si possono anche osservare (a più alto ingrandimento) i dettagli della microstruttura cellulare e si apprezza come le cellule crescano in maniera molto ramificata e dendritica, con filopodi lunghi e con morfologia complessa, suggerendo una crescita e adesione cellulare ottimale.

Inoltre, mediante la marcatura dei nuclei, è possibile notare che a 24 ore dalla piastratura le cellule stiano già crescendo e moltiplicandosi di numero.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

**Conclusioni:**

I risultati ottenuti mettono in luce l'elevata qualità topografica e della chimica della superficie implantare che ha permesso un'adesione, uno sviluppo e una crescita ottimale di queste cellule entro 24 ore dalla piastratura. Per quel che concerne questi test è possibile concludere che l'impianto analizzato sia perfettamente adeguato a permettere un'ottima osteointegrazione.

Torino, il 03/10/2014.

In fede,

Federico Mussano

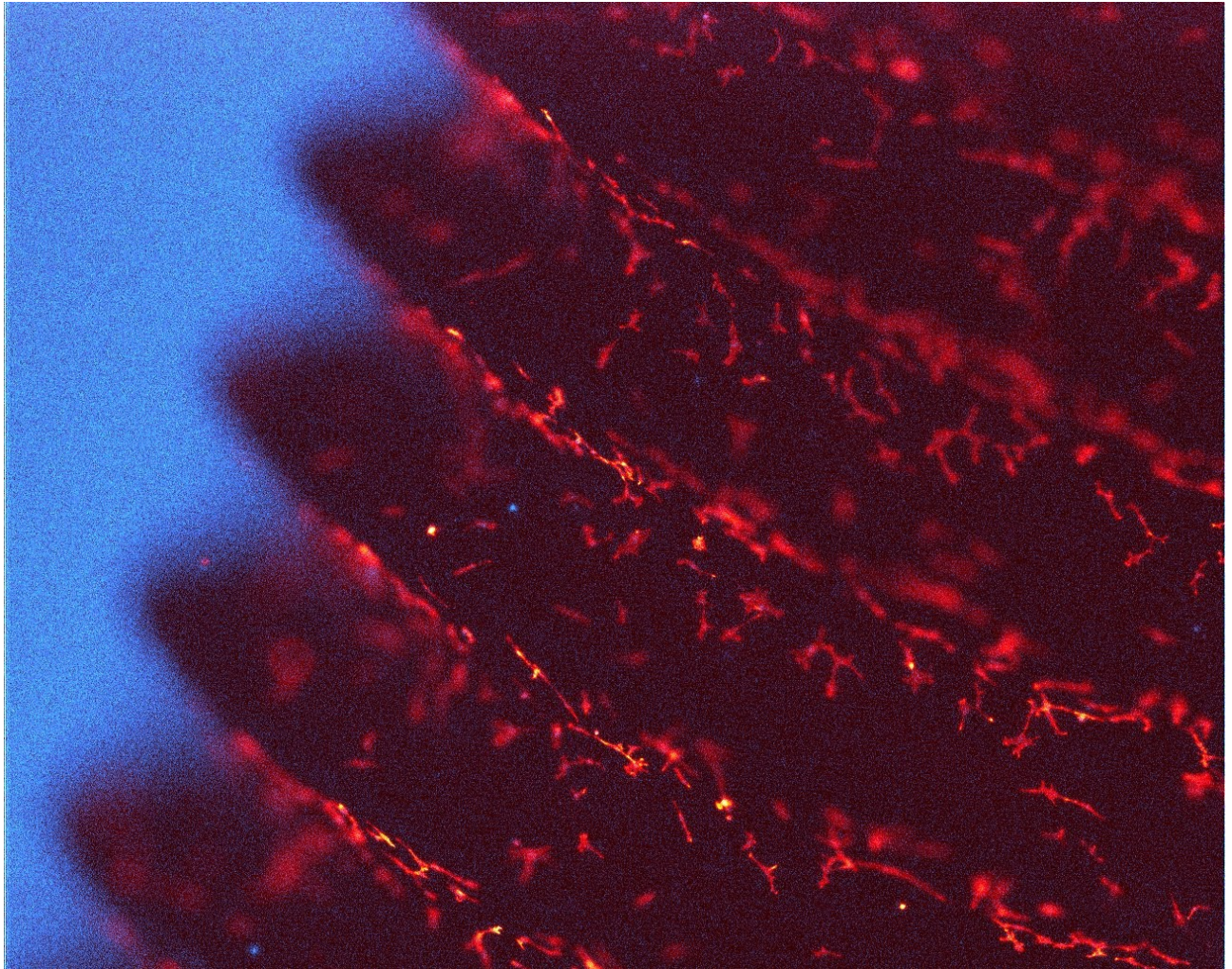
A handwritten signature in blue ink, reading "Federico Mussano".



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

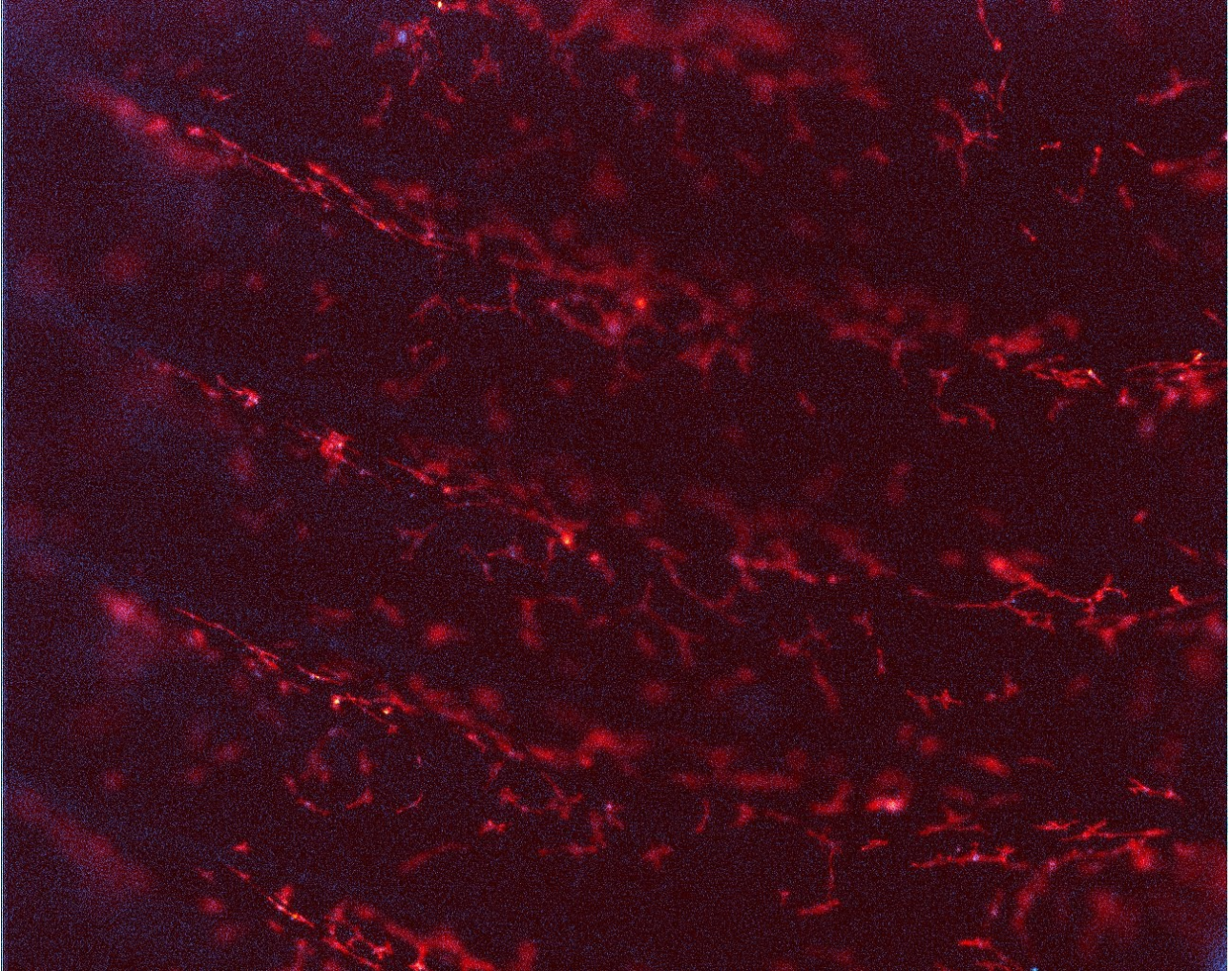
**Figure:**

**IMPIANTO con Lotto 002523 CON TRATTAMENTO SUPERFICIALE DM TECOM  
IMPLANTOLOGY**



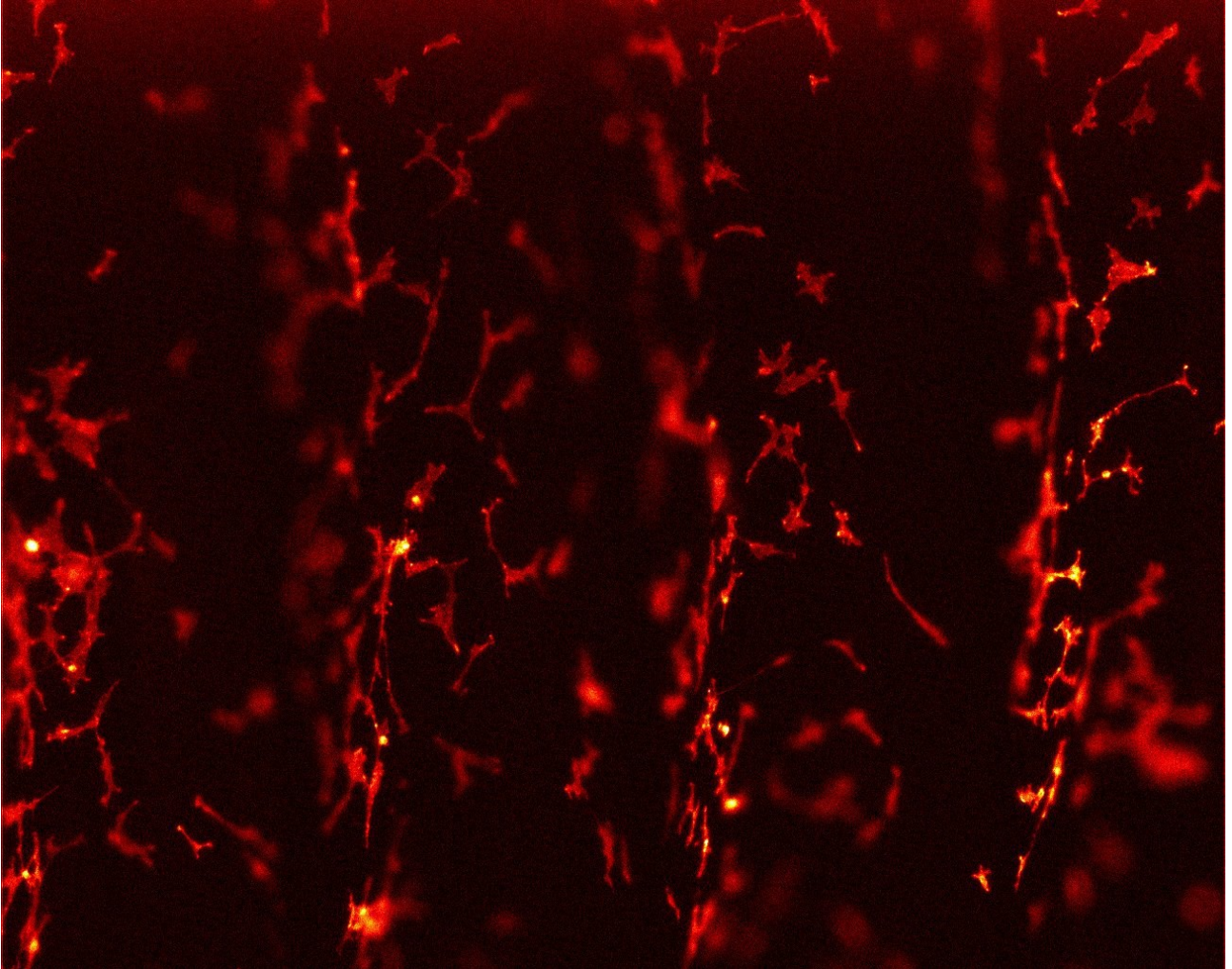


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO





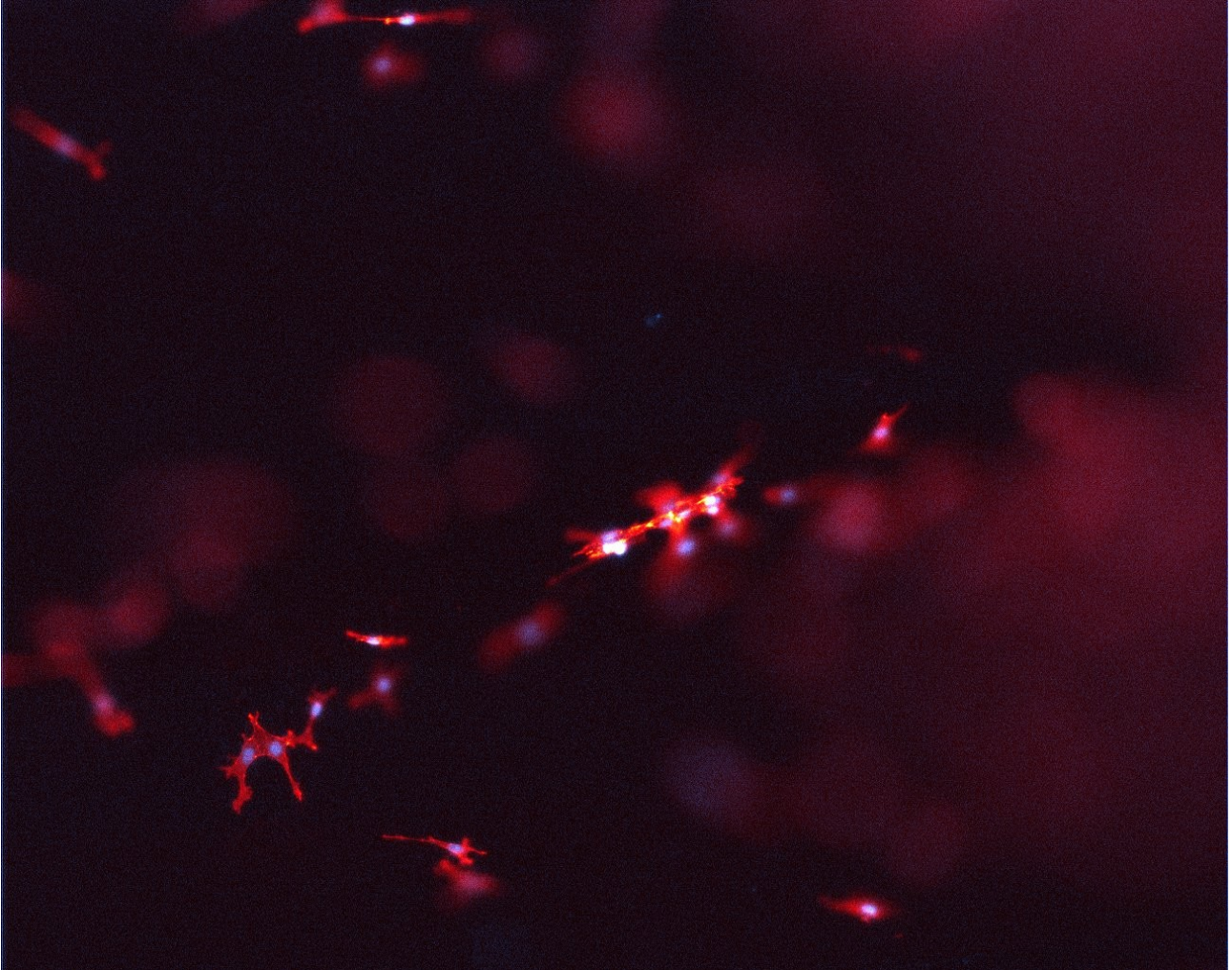
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO







UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO



**Dettagli a maggior ingrandimento**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO



**Dettagli a maggior ingrandimento**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO



**Dettagli a maggior ingrandimento**