



AGGIORNAMENTO PROFESSIONALE

PROFESSIONAL UPDATING

Giovanna Cascardo*
Clara Cassinelli**

*Laureata in Chimica

**Laureata in Scienze Biologiche

VALUTAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA SUPERFICIALE, DELLA MORFOLOGIA, DELLA CITOTOSSICITÀ E DELL'ADESIONE CELLULARE SU IMPIANTI DENTALI

EVALUATION OF SURFACE CHEMICAL COMPOSITION, DESIGN, CITOTOXICITY AND CELL ADHESION ON DENTAL IMPLANTS

RIASSUNTO

Scopo del lavoro. Nel presente lavoro, effettuato su un sistema implantare in commercio, si è voluto prendere in considerazione alcuni degli aspetti fondamentali che concorrono nel determinare le proprietà superficiali di una vite implantare che, in ultima analisi, ne determinano il risultato clinico.

Materiali e metodi. Partendo dai risultati relativi alla composizione chimica superficiale, acquisiti mediante spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), si è passati per la successiva valutazione della topografia mediante SEM ed, infine, a test in vitro con cellule di tipo osteoblastico per la valutazione della citocompatibilità e dell'influenza che questa tipologia di superficie implantare ha sull'adesione e proliferazione a tempi diversi delle stesse cellule di tipo osteoblastico.

Risultati. Le caratteristiche chimiche, fisiche e morfologiche della superficie implantare analizzata sono tali da permettere una buona colonizzazione cellulare, evidente già nelle valutazioni a 6 ore. Dopo 72 ore di contatto la proliferazione è stata notevole e la superficie risulta popolata in modo continuo da corpi cellulari molto piatti, talora difficilmente distinguibili dal fondo della superficie implantare di adesione, le cui caratteristiche morfologiche risultano non più evidenti.

Conclusioni. Le viti analizzate presentano una topografia superficiale riconducibile ad un trattamento sottrattivo di mordenzatura acida; la composizione chimica superficiale indica un buon grado di pulizia e l'assenza di residui introdotti nei vari processi di lavorazione; a corollario delle soddisfacenti proprietà superficiali, queste viti evidenziano un buon comportamento nei confronti di cellule di tipo osteoblastico.

ABSTRACT

Aim of the work. The aim of this work was to evaluate those key-points related to surface properties of a dental implant system that affect surface behavior and, as a consequence, the clinical performance.

Materials and methods. Surface composition was analysed by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), while surface design was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). In vitro tests using osteoblast-like cells were performed to evaluate cytotoxicity and the effect of surface structure on cell adhesion and growth.

Results. Surface chemical and physical properties as well as surface design of the analysed fixture significantly help cell colonization, even after 6 hours of cell-implant contact. After 72 hours significant cell proliferation occurs, and the whole surface is covered by a continuous layer of flat cells, not always easily distinguishable from the implant surface, whose design characteristics are no more noticeable.

Conclusions. The implant system analysed shows the typical surface characteristics of acid-attacked implants; surface composition data suggest an excellent degree of cleanliness and the lack of residuals due to the different production steps. As a consequence of the good surface properties, these fixtures show a favourable interaction with osteoblast-like cells.

PAROLE CHIAVE

Superficie implantare, composizione chimica, citocompatibilità, adesione cellulare.

KEY WORDS

Implant surface, chemical composition, cytocompatibility, cell adhesion.



INTRODUZIONE

Tra i tanti tasselli che concorrono alla composizione del complesso e articolato mosaico del successo di una riabilitazione implantare, le proprietà chimico-fisiche della superficie e la topografia superficiale, per quanto riguarda l'aspetto abiotico, rappresentano un punto fondamentale (1). Queste caratteristiche, infatti, influenzano il modo con cui le cellule dei sistemi biologici, che per prime entrano in contatto con il dispositivo da impianto, aderiscono e proliferano sulla superficie implantare, condizionando poi tutti gli eventi successivi (2, 3, 4, 5, 6, 7). Non a caso, quindi, le caratteristiche di superficie degli impianti dentali sono argomento di intenso studio, tanto che esiste una vasta letteratura scientifica in materia (8, 9).

Le viti da impianto presenti in commercio sono caratterizzate da finitura superficiale differente ed i pregi, veri o presunti, di una data topografia superficiale vengono spesso sfruttati a fini pubblicitari e commerciali (10). Come evidenziato nella letteratura scientifica recente, le interpretazioni basate solamente sul ruolo della topografia sono quantomeno riduttive, poiché la composizione chimica delle superfici implantari è una variabile altrettanto importante (1, 11, 12). Contrariamente alla topografia, che deriva direttamente dal processo di irruvidimento utilizzato, la chimica superficiale di una vite da impianto è influenzata in modo abbastanza complesso dai processi di lavorazione subiti, dall'accuratezza dei processi di lavaggio e decontaminazione, dalle operazioni e dai materiali di confezionamento; tutti fattori che si sovrappongono in modo più o meno marcato alle caratteristiche chimiche intrinseche delle superfici di titanio (10).

Quanto appena accennato impone che una corretta valutazione delle caratteristiche superficiali di una vite da impianto in titanio non si limiti alla valutazione al microscopio elettronico a scansione della topografia superficiale, ma si integri ad una valutazione della chimica su-

perficiale, eseguita con tecniche adeguatamente sensibili alla superficie. I risultati di queste indagini, poi, possono essere correlati alla risposta biologica in vitro, ad un primo livello di valutazione della citotossicità ed ad un secondo livello di valutazione dell'adesione e proliferazione cellulare. Questo approccio multidisciplinare di laboratorio costituisce la base comune per la definizione delle proprietà superficiali di un sistema implantare, ne permette la classificazione ed il confronto con prodotti analoghi e rappresenta la premessa per l'interpretazione del suo risultato clinico. In effetti, l'indagine di laboratorio sui sistemi implantari in commercio rivela un insieme molto più eterogeneo rispetto a quanto potrebbe far pensare la comune definizione merceologica di "viti da impianto in titanio commercialmente puro" (10, 12).

Alla luce di queste considerazioni, è stato intrapreso uno studio su un sistema implantare in commercio. Partendo dai risultati relativi alla composizione chimica superficiale, acquisiti mediante spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), si è passati alla valutazione della topografia mediante microscopia elettronica a scansione. Infine è stato eseguito il test in vitro con cellule di tipo osteoblastico per la valutazione della citocompatibilità e dell'influenza di questa tipologia di superficie implantare sull'adesione e proliferazione a tempi diversi delle stesse cellule di tipo osteoblastico.

Tutte le analisi sono state eseguite su viti in condizioni identiche a quelle di vendita (confezionate e sterilizzate), per avere la certezza di sottoporre ad indagine scientifica il dispositivo implantare effettivamente adottato nella pratica clinica quotidiana.

MATERIALI E METODI

I materiali che sono stati utilizzati sono impianti Allmed Evolution 2000, realizzati in titanio commercialmente puro, confezionati, sigillati e sterilizzati. In tabella 1 sono ri-

portati i campioni presi in considerazione, suddivisi per tipologia di analisi.

Valutazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

I campioni sono stati sottoposti ad osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM), con Energy Dispersive X-ray analysis (EDX) e valutazione SEM a basso voltaggio (LV-SEM). Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) sono state eseguite mediante un SEM LEO 420 (LEO Electron Microscopy Ltd.). I parametri salienti dell'analisi (potenziale di accelerazione degli elettroni, working distance, ingrandimento) sono riportati direttamente sulle fotografie. L'analisi EDX, ottenuta con una sonda Oxford in grado di rivelare gli elementi a partire da Be, consente di ottenere informazioni chimiche su eventuale particolato e macchie presenti. La profondità campionata è di qualche micrometro. Nelle analisi LV-SEM, il potenziale di accelerazione degli elettroni è stato mantenuto a 2 kV per consentire osservazioni a basso voltaggio. Come descritto nella letteratura a riguardo (13), la modalità LV-SEM consente di aumentare la sensibilità superficiale della tecnica e di mettere in evidenza la presenza di contaminazioni carboniose. Questo tipo di contaminazione presenta un notevole contrasto all'osservazione LV-SEM con le parti in titanio. Nell'articolo citato è stata riportata una buona corrispondenza tra risultati LV-SEM e tecniche classiche di spettroscopia superficiale, come l'XPS.

Dimensioni (mm)	Tipologia di analisi
3.75 x 10	Cellule
4.25 x 12	Cellule
3.75 x 12	SEM
4.25 x 14	SEM
3.75 x 14	XPS
3.25 x 14	XPS

Tab. 1: identificazione dei campioni analizzati e suddivisione per tipologia di analisi.



Valutazione della composizione chimica superficiale

I campioni sono stati sottoposti ad analisi XPS, per valutare la composizione chimica della superficie e la presenza di contaminanti. In particolare, la composizione chimica della superficie delle viti è stata valutata mediante analisi XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy). Questo tipo di tecnica consente di ottenere la composizione qualitativa e quantitativa degli strati più esterni dei materiali (nel caso dei metalli, la profondità analizzata è di circa 5 nanometri) e fornisce quindi un'indicazione diretta della composizione chimica degli strati del materiale che vengono a effettivo contatto con il tessuto osseo.

L'analisi XPS è stata eseguita con uno strumento Perkin Elmer PHI 5500 ESCA System. Esso è dotato di una sorgente a raggi X monocromatica (anodo di Al), mantenuto a 14 kV con potenza di 200 W. Il diametro della zona analizzata era di circa 400 mm, la profondità circa 5 nm. La pressione all'interno della camera di analisi è stata mantenuta a circa 10⁻⁸ Pa. L'analisi è stata eseguita nella zona filettata della vite. Il risultato dell'analisi è espresso in % atomico.

Valutazione della citotossicità

Le cellule utilizzate per la valutazione della citotossicità sono di tipo osteoblastico da osteosarcoma umano; in particolare, si tratta delle cellule della linea SaOS-2. Le prove di citotossicità sono state condotte secondo i protocolli contenuti nella norma EN ISO 10993-5: Valutazione Biologica dei Dispositivi Medici Prove per la citotossicità in vitro.

Una sospensione di 1,25x10⁵ osteoblasti SaOS-2 (ottenuta mediante aggiunta di 2 mL di soluzione tripsina/EDTA al monostrato contenuto in una fiasca T75 Falcon) in 2,5 mL di terreno McCoy's 5a (Sigma-Aldrich, Milano), addizionato di 15% di siero di feto bovino, L-glutammina, penicillina, streptomycin e amfotericina B è stata introdotta in contenitori sterili in polistirene a 12 scomparti (12

multiwells plate, Corning). Contemporaneamente, estratte dalla confezione sterile sotto cappa a flusso laminare, sono state introdotte anche 2 viti. I contenitori sono stati successivamente posti in incubatore Hera Cell (Heraeus Kulzer) a 37 °C, 5% di CO₂ e umidità relativa del 98%, per un periodo di 72 ore. Il controllo negativo (cioè per definizione privo di effetti citotossici) della prova era costituito da 5 campioni di cilindri d'oro puro di circa le stesse dimensioni, mentre il controllo positivo (per definizione citotossico) era costituito da 5 cilindri di lega Cu-Ni-Al.

Al termine delle 72 ore di crescita le cellule Saos-2 cresciute a diretto contatto con i campioni sono state osservate al microscopio ottico invertito (Leitz DM IL). In particolare, si è valutata la presenza di cellule morte, di cellule giganti multinucleate o di anomalie generali della morfologia cellulare, il tutto a confronto con quanto osservato a livello dello strato cellulare a contatto con i controlli negativi e positivi. Dopo l'osservazione microscopica le cellule sono state fissate con soluzione tampone fosfato Phosphate Buffered Saline più 4% di glutaraldeide, colorate con blu di toluidina (0,5% in acqua) e infine fotografate con macchina digitale (Nikon Coolpix 995).

Valutazione dell'adesione cellulare

Le prove di adesione cellulare sono state condotte secondo i protocolli contenuti nella bibliografia internazionale, utilizzando la stessa linea cellulare SAOS-2. Una sospensione di 1,25x10⁵ osteoblasti SaOS-2 (ottenuta come in precedenza) è stata introdotta in contenitori sterili in polistirene a 12 scomparti. Contemporaneamente, estratte dalla confezione sterile sotto cappa a flusso laminare, sono state introdotte 6 viti. I contenitori sono stati successivamente posti in incubatore a 37 °C, 5% di CO₂ e umidità relativa del 98%, alcuni per un periodo di 6 ore, altri per 24 e altri ancora per 72 ore.

Quindi, al termine di ciascuno dei

tre periodi di incubazione, le cellule cresciute in presenza delle viti sono state osservate al microscopio ottico invertito, per escludere con certezza la presenza di fenomeni citotossici. Dopo accurata osservazione i campioni sono stati asportati dai pozzetti di polistirene, delicatamente lavati con PBS per rimuovere le cellule non aderenti, sottoposti a fissazione con glutaraldeide 4% in PBS, disidratati con miscele acqua ed etanolo a concentrazione crescente di etanolo, infine con etanolo puro. Dopo asciugatura, i campioni, collocati su opportuni supporti adesivi, sono stati ricoperti con un sottile strato d'oro (Agar Auto Sputter Coater). Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) sono state eseguite mediante un SEM LEO 420 (LEO Electron Microscopy Ltd). Aree scelte casualmente sono state fotografate a differenti ingrandimenti per ciascun campione.

RISULTATI

L'osservazione al SEM dei campioni ha innanzitutto rivelato una sostanziale omogeneità di topografia superficiale, evidenziando una buona riproducibilità di trattamento. Tipici risultati ottenuti sono riportati nelle figure 1, 2, 3 e 4. In particolare, le figure 1 e 2 presentano immagini a basso ingrandimento, che consentono di valutare il profilo meccanico della vite. Passando ad immagini a maggiore ingrandimento, la figura 3 evidenzia la topografia superficiale irruvidita. I dettagli osservabili a questi ingrandimenti elevati non lasciano dubbi sul tipo di trattamento, che ha senz'altro previsto un robusto attacco con acido fluoridrico. I tipici "sbuffi" chiari non sono residui estranei ma una tipica conseguenza morfologica dell'azione dell'acido fluoridrico sul titanio. Per completare l'osservazione al SEM, la figura 4 è stata ottenuta a basso voltaggio (2 kV). Come riportato nella sezione materiali e metodi e nella letteratura scientifica a riguardo, questo tipo di indagine è in grado di evidenziare eventuali residui di lubri-

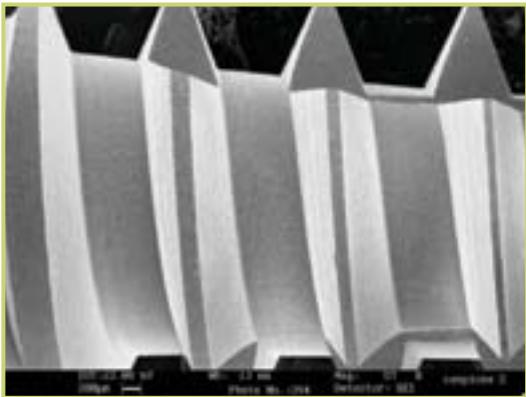


Fig. 1: immagine SEM (57 x) della vite da impianto analizzata.

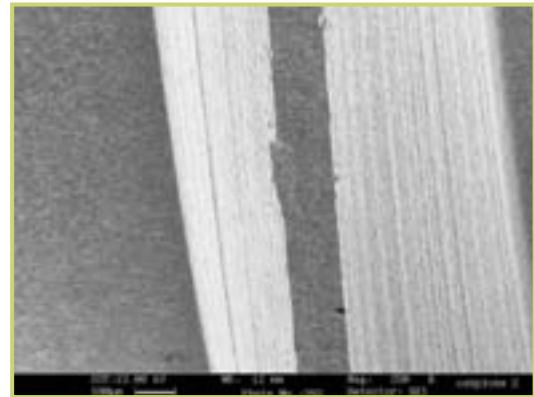


Fig. 2: immagine SEM (250 x) della vite da impianto analizzata.

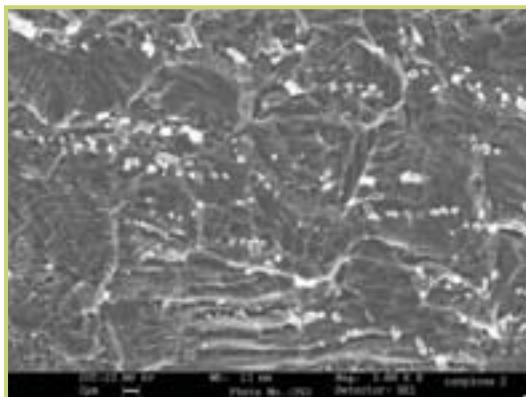


Fig. 3: immagine SEM (5000 x) della vite da impianto analizzata.

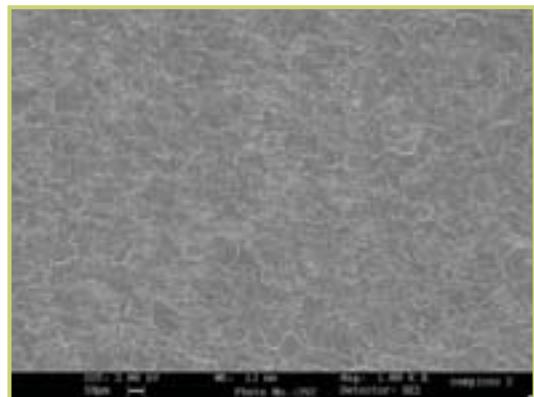


Fig. 4: immagine SEM a basso voltaggio (LV-SEM) della vite da impianto analizzata.

Campione	C	O	Ti	N	Si	F
1	43,0	38,5	14,6	2,6	1,2	0,2
2	42,6	38,7	14,8	1,9	1,9	0,1

Tab. 2: composizione superficiale (% atomico) dei campioni analizzati.

ficanti o oli di lavorazione come macchie nere. In questo caso, l'assenza di tali formazioni suggerisce come la superficie sia ragionevolmente priva di contaminanti organici superficiali. Questa osservazione introduce le valutazioni sulla composizione chimica superficiale del sistema implantare in esame, come descritta dall'analisi XPS.

I risultati dell'analisi XPS, eseguita su due campioni diversi, sono riportati in tabella 2. Prima di affrontare una discussione dettagliata dei risultati, è bene ricordare alcune considerazioni generali sul tipo di risultato espresso dall'analisi

XPS (2, 10, 13). In particolare, poiché la tecnica utilizzata misura uno spessore di pochi nanometri, essa vede prevalentemente lo strato superficiale di ossido e non il sottostante titanio metallico. La composizione ideale teorica della superficie di una vite in titanio, analizzata mediante questa tecnica, sarebbe quindi 33% Ti e 66% O (TiO_2), anche se il titanio ha purezza superiore al 99%. Inoltre, in un'atmosfera quale quella terrestre, è sempre attesa sulle superfici la presenza di carbonio: esso deriva dalla presenza di molecole carboniose inevitabilmente presenti nell'atmosfera ter-

restre, combinate in modo fisico o chimico con la superficie. Queste molecole vengono rilevate da un'analisi specifica per la superficie come l'XPS ma risultano invisibili nei metodi di analisi più tradizionali, che prendono in considerazione la globalità del materiale. Il carbonio può ovviamente derivare anche da contaminazioni più "pesanti", quali contatto con oli o grassi durante la lavorazione. In generale e con le dovute cautele, percentuali di carbonio del 30-45% in analisi XPS sono fisiologiche e possono essere considerate normali. Percentuali più elevate indicano invece la presen-



PROFESSIONAL UPDATING

za di contaminazione.

Sulla base di quelle considerazioni, della letteratura in materia e dei risultati ottenuti, si può affermare che le viti analizzate presentano una composizione superficiale soddisfacente. In particolare le viti presentano un valore di Ti superiore attorno al 14% e una buona riproducibilità di valori. Questo dato conferma l'osservazione LV-SEM (13), che non evidenziava la presenza di significativa contaminazione carboniosa. Per quanto riguarda gli altri elementi osservati, il fluoro deriva probabilmente dai processi di acidatura e decontaminazione. Questo elemento è presente in quantità molto basse, decisamente entro la norma. Per quanto riguarda gli altri elementi osservati, sono in quantità comunemente presenti sulle superfici delle viti da impianto.

Lo spirito dell'approccio interdisciplinare alla caratterizzazione di laboratorio delle superfici implantari richiede il confronto tra parametri chimico-fisici e comportamento cellulare. Sotto questo aspetto, le confortanti evidenze ottenute dall'analisi SEM ed XPS suggeriscono l'assenza di elementi potenzialmente tossici e residui pericolosi sulla superficie della vite. Questa asserzione è confermata dalle prove di citotossicità, documentate nelle figure da 5 a 8. In particolare, le figure 5 e 8 si riferiscono ai controlli negativo e positivo, che forniscono i risultati attesi, consentendo quindi di accettare come valido l'esperimento attuato.

Nello specifico, la figura 5 si riferisce al controllo negativo ed illustra il risultato ottenuto con le cellule SAOS-2 cresciute a contatto con il campione privo di effetti citotossi-

ci (la porzione scura è il profilo del campione, che è ovviamente opaco in queste osservazioni microscopiche): da questa immagine si deduce la totale assenza di effetti tossici a livello del monostrato cellulare. Lo stesso tipo di risultato è stato evidenziato con gli impianti analizzati (figura 6 e, a maggiore ingrandimento, figura 7): in queste immagini è possibile osservare il profilo dell'impianto completamente circondato dagli osteoblasti SAOS-2. La densità cellulare e la morfologia sono del tutto confrontabili con quanto evidenziato per il controllo negativo, a dimostrazione del fatto che sono assenti fenomeni di rilascio di molecole citotossiche. Al contrario, nel caso del campione relativo al controllo positivo (lega Cu-Ni-Al, fig. 8), la maggior parte delle cellule del contenitore era morta. I dati ottenuti sono

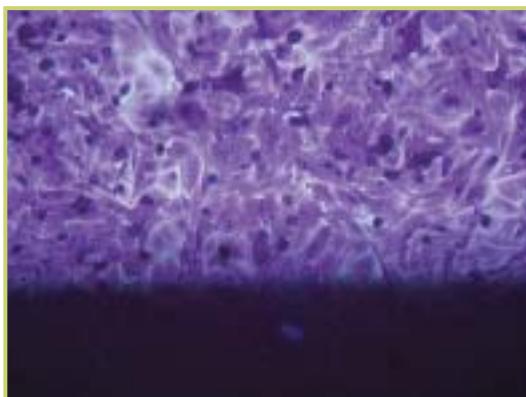


Fig. 5: risultati del test di citotossicità. Controllo negativo.

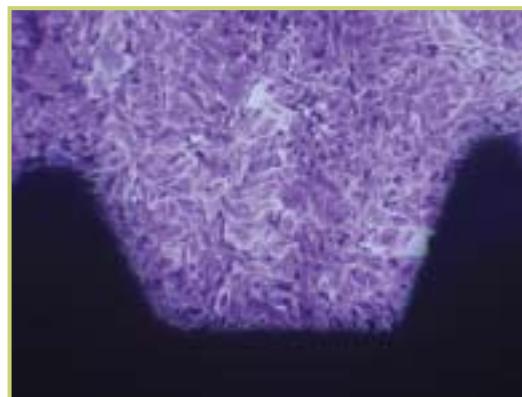


Fig. 6: risultati del test di citotossicità sui campioni in esame.

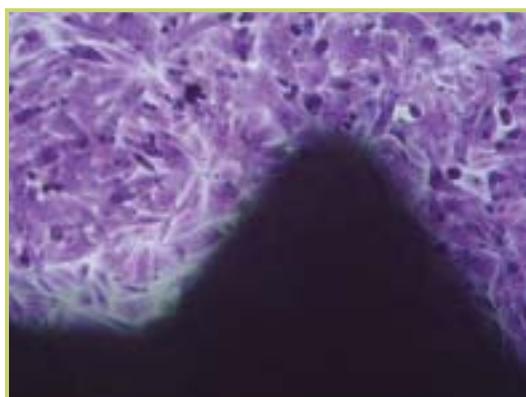


Fig. 7: risultati del test di citotossicità sui campioni in esame.

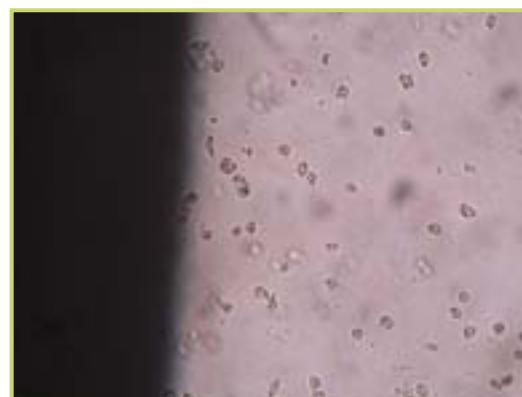


Fig. 8: risultati del test di citotossicità. Controllo positivo.



Materiale	Scala di citotossicità	Interpretazione
Impianto a vite Δ 3,75 lung. 10 mm	0	Non citotossico
Controllo negativo	0	Non citotossico
Controllo positivo	3	Gravemente citotossico

Tab. 3: risultati dei test di citotossicità espressi secondo la norma EN ISO 10993-5.

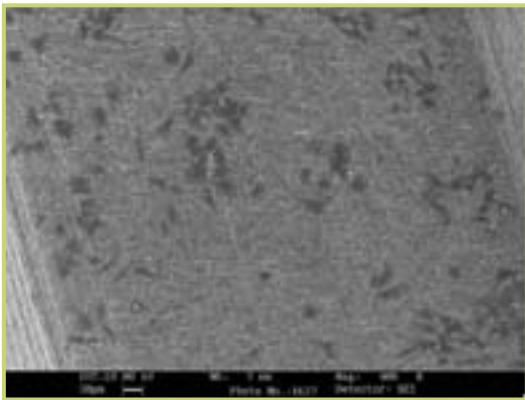


Fig. 9: immagine SEM (400 x) ottenuta dopo 6 ore di contatto tra vite da impianto e cellule osteoblastiche.

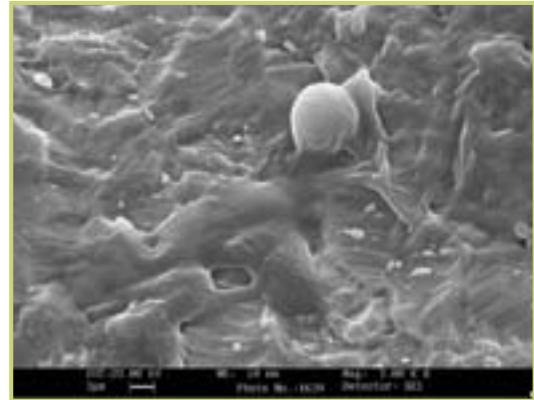


Fig. 10: immagine SEM (5000 x) ottenuta dopo 6 ore di contatto tra vite da impianto e cellule osteoblastiche.

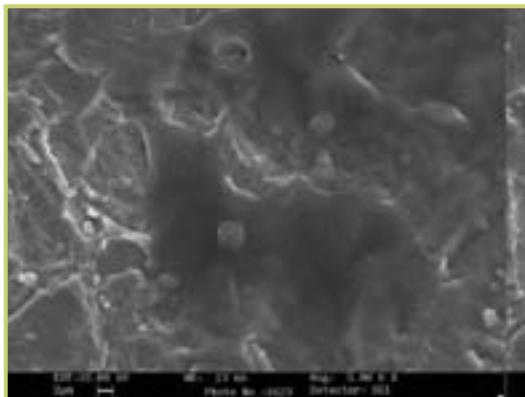


Fig. 11: immagine SEM (5000 x) ottenuta dopo 24 ore di contatto tra vite da impianto e cellule osteoblastiche.

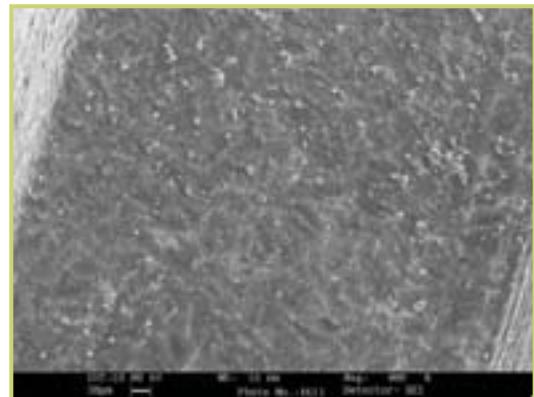


Fig. 12: immagine SEM (400 x) ottenuta dopo 72 ore di contatto tra vite da impianto e cellule osteoblastiche.

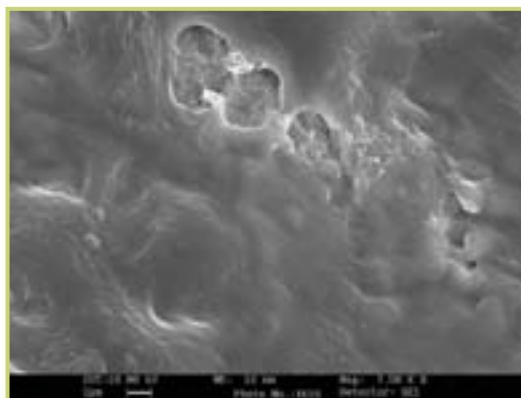


Fig. 13: immagine SEM (7500 x) ottenuta dopo 72 ore di contatto tra vite da impianto e cellule osteoblastiche.



espressi secondo la norma EN ISO 10993-5 in tabella 3.

Per completare il set di esperimenti, sono state eseguite valutazioni di adesione cellulare sulle superfici delle viti da impianto. Le foto ottenute dopo 6 ore di contatto indicano, come ben visibile nelle immagini a basso ingrandimento (esempio, figura 9), le prime fasi di colonizzazione della superficie impiantare da parte delle cellule (che risultano all'osservazione con microscopia elettronica a scansione come macchie più scure rispetto alla superficie grigio chiara del titanio). La densità cellulare ancora bassa consente di evidenziare in moltissime aree i dettagli della morfologia della superficie dell'impianto, impartiti dai trattamenti di mordenzatura. Le osservazioni a maggiori ingrandimenti (sempre sui campioni posti a contatto per 6 ore, in fig. 10) mostrano come convivano cellule osteoblastiche già caratterizzate da forma appiattita, che tende a riprodurre la superficie sottostante, e cellule ancora con morfologia decisamente tondeggiante, molto più vicina alla morfologia sferica che caratterizza le cellule in sospensione. Dopo 6 ore di contatto, le cellule in fase di avvicinamento e adesione alla superficie impiantare non hanno ancora avuto il tempo di proliferare e, di conseguenza, raggiungere una certa densità. Occorre però aggiungere che in questa fase della valutazione l'aspetto quantitativo risulta relativamente poco importante; il risultato davvero rilevante, mai banale né scontato, è che le caratteristiche chimiche, fisiche e morfologiche della superficie sono tali da non ostacolare l'adesione delle cellule osteoblastiche. Le immagini ottenute dopo le 24 ore di contatto mettono in risalto una maggiore densità (le cellule, cioè, si sono riprodotte) e una morfologia che tende ulteriormente ad appiattirsi (fig. 11). Diventano sempre più limitate le zone di superficie "non coperte" da cellule.

Dopo 72 ore di contatto la proliferazione è stata notevole (fig. 12) e la superficie risulta popolata in mo-

do continuo da corpi cellulari molto piatti, talora difficilmente distinguibili dal fondo della superficie impiantare di adesione, le cui caratteristiche morfologiche risultano non più evidenti (fig. 13). Questa osservazione indica che il rapporto tra superficie impiantare e sistema biologico in vitro è evoluto nella direzione sperata, cioè al processo di adesione e colonizzazione della superficie è seguito un ottimo processo di proliferazione.

CONCLUSIONI

Il lavoro presentato ha voluto prendere in considerazione alcuni degli aspetti fondamentali che concorrono a determinare le proprietà superficiali di una vite impiantare e, in ultima analisi, il suo risultato clinico. L'esistenza di una consolidata letteratura del settore consente ormai di classificare le superfici impiantari non solo secondo la tradizionale valutazione morfologica, ma anche secondo gli aspetti più propriamente chimici e di correlazione con i processi di trattamento superficiale e decontaminazione (10, 12). Nel caso in esame, le viti da impianto Allmed Evolution 2000 presentano una topografia superficiale riconducibile ad un trattamento sottrattivo di mordenzatura acida eseguito con acido fluoridrico; la composizione chimica superficiale indica un buon grado di pulizia e l'assenza di residui introdotti nei vari processi di lavorazione; a corollario delle soddisfacenti proprietà superficiali, queste viti evidenziano un buon comportamento in vitro nei confronti di cellule di tipo osteoblastico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Davies JE. The bone-biomaterial interface. Toronto: University of Toronto Press; 1991
- 2) Davies JE. Bone Engineering. Toronto: em squared; 2000
- 3) Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. J Prosthet Dent

2000 Nov;84(5):522-34.

4) Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials 1999 Dec;20(23-24):2311-21.

5) Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alpha,25-(OH)2D3. J Biomed Mater Res 1998 Jan;39(1):77-85.

6) Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. J Biomed Mater Res 1996 Sep;32(1):55-63.

7) Boyan BD, Schwartz Z. Modulation of osteogenesis via implant surface design. In: Davies JE. Bone Engineering. Toronto: em squared; 2000. p. 232-9.

8) Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). J Biomed Mater Res 1995 Mar;29(3):389-401.

9) Lazzara RJ. Bone response to dual acid etched and machined titanium implant surfaces. In: Davies JE. Bone Engineering. Toronto: em squared; 2000. p. 381-390

10) Morra M, Cassinelli C, Di Carlo F. Le superfici impiantari. In: Malchiodi L. Chirurgia impiantare. Bologna: Edizioni Martina; 2003

11) Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, Fini M. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis. Int J Oral Maxillofac Implants 2003 Jan-Feb;18(1):40-5.

12) Cassinelli C, Morra M, Bruzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, Fini M. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. Int J Oral Maxillofac Implants 2003 Jan-Feb;18(1):46-52.

13) Morra M, Cassinelli C. Evaluation of surface contamination of dental implants by LV-SEM: comparison with XPS analysis. Surf Interf Anal 1997; 25:983-988.