

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

DOTTORATO DI RICERCA IN:
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
CICLO XXVII

COMPLICANZE NELLA TERAPIA IMPLANTARE: LA PERIMPLANTITE

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Barbara Zavan

Dottorando: Dott. Luca Sbricoli

A tutti quelli che mi supportano e sopportano

Riassunto

La Perimplantite è una malattia infiammatoria, che colpisce i tessuti molli e l'osso di supporto attorno agli impianti dentali. Sebbene sia descritta come una delle più comuni complicanze nel trattamento con impianti dentali, non sono mai stati descritti il meccanismo attraverso cui si sviluppa, l'eziopatogenesi e il modello della successiva perdita ossea.

Nel nostro studio, ci siamo concentrati sull'individuazione di possibili fattori genetici associati allo sviluppo di questa condizione patologica. Utilizzando un array CGH, abbiamo analizzato il DNA di 35 pazienti per identificare la presenza di uno squilibrio genetico potenzialmente correlato con la perimplantite. I dati ottenuti confermano la presenza di piccole duplicazioni nel gene VEGF-A. L'espressione di questo gene ha determinato una bassa espressione di marcatori endoteliali, come CD31 e il fattore di Von Willebrand, nel tessuto con perimplantite, al contrario che nel tessuto sano. Inoltre, analisi dettagliate dei marcatori ossei hanno rivelato la presenza di uno squilibrio del turnover osseo a favore di osteoclastogenesi piuttosto che osteoblastogenesi. Alti livelli di espressione di RANKL e HGF, che sono entrambi coinvolti nel riassorbimento osseo, e bassi livelli di Runx, RHOA, e WNT, che sono coinvolti nella formazione ossea, hanno indicato uno squilibrio importante nel normale processo di turnover osseo. Inoltre, l'alta espressione di proteine zinc finger 467, un regolatore della relazione osteoblasti/adipociti, e la presenza di tessuto adiposo hanno suggerito il verificarsi di un processo de-regolativo a livello delle cellule staminali mesenchimali.

Abstract

Peri-implantitis is an inflammatory disease, affecting the soft surrounding tissue and supporting bone around dental implants. Although described as one of the most common complications in the treatment with dental implants, the underlying mechanisms, etiopathology and pattern of subsequent bone loss in peri-implantitis has been poorly described.

In our study, we are focusing on the identification of possible genetic factors in peri-implantitis as associating factors in developing this pathological condition. Using a CGH array, we screened the DNA of 35 patients to identify the presence of a genetic imbalance potentially correlated with peri-implantitis. The data obtained confirmed presence of small duplication in the VEGF-A gene. Expression of this gene resulted in lower expression of endothelial markers, such as CD31 and von Willebrand factor, in peri-implantitis tissue versus healthy tissue. Moreover, detailed analyses of bone biomarkers revealed the presence of an imbalance in bone turnover in favor of osteoclastogenesis rather than osteoblastogenesis. High expression levels of RANKL and HGF, both of which are involved in bone resorption, and low levels of RUNX, RHOA, and WNT, which are involved in bone formation, indicated an important imbalance in the normal bone turnover process. In addition, high expression of zinc finger protein 467, a regulator of osteoblast/adipocyte commitment, and the presence of adipose-like tissue suggested the occurrence of a de-regulative process at the mesenchymal stem cell level.

INTRODUZIONE	3
1. Edentulismo e Implantologia	3
1.a Il problema dell'edentulismo.....	3
1.b L'implantologia osteointegrata.....	5
1.c Gli impianti dentali.....	8
1.d La Placca Dentaria.....	14
2. Definizione e Classificazione di Perimplantite.....	16
2.a Definizione di Mucosite e Perimplantite	16
2.b Meccanismi di Distruzione Ossea.....	18
2.c Diagnosi e prevalenza della perimplantite.....	19
2.d Classificazione delle perimplantiti.....	21
2.e Implicazioni cliniche delle perimplantiti	23
3. Trattamento della perimplantite.....	23
3.a Linee guida nel trattamento della perimplantite.....	23
3.b Terapie proposte.....	24
4. Attualità e sviluppi futuri	26
4.a Influenza delle superfici sullo sviluppo di perimplantite	26
4.b Correlazione con patologie sistemiche	27
4.c Genetica e Perimplantite	28
4.d Analisi CGH-array.....	30
MATERIALI E METODI.....	32
1. Dichiarazione Etica	32
2. Analisi CGH-array	32
3. Preparazione dei campioni per analisi morfologica	33
3.a Colorazione ematossilina eosina.....	33
3.b Fissaggio per immunofluorescenza.....	33
4. Analisi TEM.....	34
5. Estrazione e quantificazione di RNA.....	35
6. Sintesi del DNA complementare.....	36
7. Real Time PCR	37
8. Analisi Statistica.....	40

RISULTATI	42
1. Aberrazione Cromosomica	42
2. Vascolarizzazione	43
3. Processo di guarigione delle ferite	45
4. Osteoblastogenesi	49
5. Adipogenesi	50
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	52
BIBLIOGRAFIA.....	57

INTRODUZIONE

1. Edentulismo e Implantologia

1.a Il problema dell'edentulismo

L'assenza di una corretta salute orale nella popolazione adulta è una condizione che può avere risvolti socio-economici rilevanti. Infatti, una scarsa igiene orale si ripercuote negativamente sulla qualità di vita di un individuo, sia in termini di relazioni interpersonali, sia in termini di comuni azioni quotidiane, come l'alimentarsi o il sorridere.

Inoltre, studi clinici hanno messo in relazione la scarsa igiene orale, in particolare la malattia parodontale, a numerose patologie sistemiche acute e croniche, come polmonite, malattie cerebrovascolari, infarto e diabete (Cinar & Schou, 2014, Tavares et al., 2014).

La mancanza di uno o più denti è una situazione ancora oggi relativamente frequente nella popolazione mondiale. Fino alla metà del ventesimo secolo la grande maggioranza della popolazione sopra i 60 anni era priva di denti. Col passare degli anni, tuttavia, i più recenti studi epidemiologici, condotti su popolazioni europee, hanno documentato un calo dell'edentulia, con grandi differenze nella prevalenza tra i paesi europei, tra le regioni geografiche all'interno dei paesi e tra gruppi di diversa estrazione sociale. Musacchio et al. hanno riportato una prevalenza di edentulismo del 43,8% nel nord-est Italia. Considerando i gruppi d'età, la percentuale è del 31,8% nella popolazione tra i 65 e i 70 anni e cresce con l'avanzare dell'età fino a quasi raddoppiare (63,9%) nella fascia dei novanta anni. I soggetti fumatori hanno una frequenza doppia (55,6%) rispetto ai non fumatori (26%) di edentulia. Le percentuali cambiano anche in relazione ai livelli di istruzione: 52% di edentulismo nelle persone con 0-3 anni di istruzione, 44,3% nella fascia 4-8 anni, 3,3% nelle persone con più di otto anni di istruzione (Musacchio et al., 2007).

Tuttavia, si è ancora lontani dal raggiungere gli obiettivi posti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), che auspicava per il 2001 meno del 5% di edentulismo a 64-74 anni e il 75% di quei soggetti con almeno 20 denti funzionali. Si può quindi affermare che il problema dell'edentulismo sia ancora attuale e che esso si manifesti in maniera più evidente con l'aumentare dell'età.

La mancanza di una corretta funzione masticatoria si ripercuote negativamente sulla qualità di vita dell'individuo. In particolare, Krall et al. hanno dimostrato che le persone edentule consumano meno frutta e verdura rispetto alle persone con una dentatura completa (Krall et al., 1998). Più nello specifico, è stato verificato un aumento nell'introduzione di grassi saturi e una contestuale diminuzione di fibre alimentari e vitamine.

L'edentulismo si ripercuote, oltre che sulla compromissione della funzione masticatoria, anche sulla percezione che l'individuo ha di se stesso. Fiske et al., ha riportato le sensazioni provate da 50 persone in seguito alla perdita dei denti: diminuita autostima, alterazione dell'immagine di sé, imbarazzo nell'affrontare l'argomento dell'edentulismo, invecchiamento precoce dell'aspetto, diminuita propensione ai rapporti sociali (Fiske et al., 1998).

Papadaki e Anastassiadou hanno approfondito la questione e hanno intervistato ottanta portatori di protesi mobile totale. I questionari sottoposti per indagare la reazione emozionale alla perdita di denti hanno rivelato che: il 60% dei soggetti non solo ha avuto difficoltà nell'accettare la perdita dei denti, ma il 65% dei soggetti più giovani e il 47% di quelli più anziani hanno impiegato più di sei mesi per accettare la nuova condizione. Un quinto dei pazienti ha riferito di aver provato una sensazione di rassegnazione nel perdere gli ultimi denti, mentre un quarto ha riportato tristezza (Papadaki & Anastassiadou, 2012). Lo stesso studio rivela che, nonostante una parte dei soggetti sia soddisfatto della propria dentiera, una porzione significativa delle persone che perdono

tutti i denti ha sviluppato problemi psicologici in relazione alla loro condizione di edentulia.

Negli scorsi decenni l'unica soluzione disponibile per il ripristino della dentatura era la protesi mobile completa, comunemente conosciuta come dentiera. Questo tipo di soluzione si basa sulla ritenzione offerta dalla cresta ossea residua. Tuttavia, mentre l'arcata superiore offre un valido punto di ancoraggio grazie all'effetto ventosa ricercato dall'odontoiatra, lo stesso non si può dire per l'arcata inferiore, dove un riassorbimento marcato della cresta alveolare complica notevolmente il ripristino della masticazione. Inoltre, l'inevitabile riassorbimento progressivo della struttura ossea dei mascellari, a causa della prolungata assenza di denti, comporta la necessità di continui adattamenti della protesi. Il successo di questo tipo di protesi è variabile e dipende principalmente dalla capacità del paziente di adattarsi alle limitazioni che comporta la protesi stessa.

1.b L'implantologia osteointegrata

L'implantologia osteointegrata ha offerto nuove prospettive nel campo della riabilitazione protesica, mostrando uno sviluppo notevole negli ultimi trent'anni. Ad oggi, viene considerata come la scelta d'elezione sia per la sostituzione di un singolo elemento dentario, mancante a causa di carie, malattia parodontale, trauma o agenesia, sia per il ripristino di intere arcate dentarie.

I primi tentativi di ripristinare elementi dentari persi risalgono agli antichi Egizi e alle civiltà del Sud America. Sono giunti fino ai giorni nostri reperti archeologici che testimoniano inserzioni di pezzi di conchiglia, minerali e osso, lavorati per adattarli agli alveoli privi di denti. L'inadeguatezza degli strumenti chirurgici e l'assenza di terapie antibiotiche decretò il fallimento di questi esperimenti, anche nei secoli successivi. Nel 1809 Maggiolo, italiano emigrato in Francia, riporta nel suo "Manuel de l'art

dentaire” la relazione di un impianto in oro inserito in un sito post-estrattivo, dove la protesi definitiva venne realizzata solo dopo la cicatrizzazione della ferita.

L'introduzione di leghe a base di cromo rivoluzionò la storia degli impianti dentali. Nel 1938 Adams brevettò la prima vite endossea piena, che emergeva attraverso la gengiva con una testa di forma sferica cui ancorare una protesi rimovibile con un meccanismo simile a quello utilizzato ancora oggi.

I primi ad effettuare studi istologici di implantologia sui cani furono i fratelli Strock, ad Harvard, nel 1939. Il loro impianto era una vite filettata in lega cromo-cobalto, che rimase stabile e asintomatica nel cavo orale del paziente fino alla sua morte nel 1955. L'arco di tempo tra il 1940 e il 1975 fu una fucina di nuove idee, che portarono allo sviluppo di numerose varianti implantari (impianti a vite, a lama, sottoperiostei, a “T” rovesciata, etc.).

Una vera e propria pietra miliare nella storia dell'implantologia fu posta nel 1978 dallo svedese Brånemark, che introdusse il concetto di “osteointegrazione”. L'osteointegrazione è il punto di partenza imprescindibile su cui si basa ancora oggi l'implantologia e può essere definita come la fusione strutturale e funzionale tra la superficie dell'impianto e l'osso circostante (Fig 1 e 2).



Fig. 1: Il Professor Brånemark, pioniere dell'implantologia osteointegrata

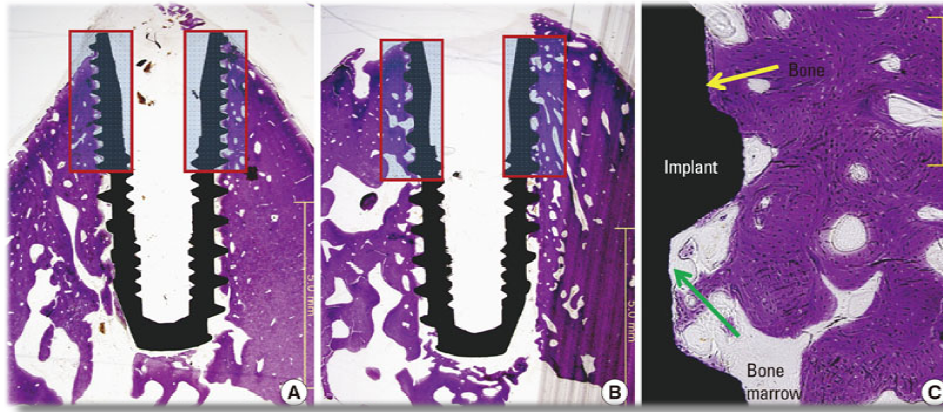


Fig. 2: Il concetto di osteointegrazione: intima unione tra superficie dell'impianto in titanio e osso circostante

Quando questa intima unione tra le due superfici viene a mancare si sviluppano complicanze che portano ad un insuccesso implantare, che può arrivare a mettere a rischio la sopravvivenza dell'impianto stesso all'interno del cavo orale. Per parlare di successo in terapia implantare vengono utilizzati parametri clinici e radiografici. Albrektsson et al. per primi hanno definito successo implantare l'assenza di mobilità, di sintomatologia e di riassorbimento osseo marginale di 1.5 mm nel primo anno e di 0.2 mm negli anni successivi (Albrektsson et al., 1986). Secondo questi parametri la percentuale di successo a 10 anni era circa dell'80%. Successivamente, altri autori (Buser et al., 2004, Hammerle et al., 1996) hanno posto l'attenzione anche sui tessuti molli, aggiungendo ai criteri di successo la presenza di un sondaggio fisiologico della mucosa perimplantare e una morfologia dento-gengivale paragonabile a quella della dentatura naturale. Negli anni è stato abbandonato il concetto di riassorbimento di 1.5 mm, dovuto alla formazione dell'ampiezza biologica per gli impianti inseriti in posizione sottocrostante (Berglundh & Lindhe, 1996).

È opportuno, tuttavia, distinguere il successo dalla sopravvivenza. Lang et al. parlano di sopravvivenza implantare quando un impianto rimane nel cavo orale per un numero indeterminato di anni senza problematiche di tipo estetico o funzionale, indipendentemente da

sondaggio e perdita d'osso (Lang et al., 2004). In base a questa definizione le percentuali di sopravvivenza raggiungono l'89.4% per corone singole e l'86.7% per impianti che supportano ponti (Pjetursson et al., 2007)

Le cause di fallimento implantare possono essere: trauma chirurgico durante l'inserimento o le successive fasi protesiche, infezioni, tabagismo, patologie ossee locali, patologie sistemiche. Quando l'insuccesso implantare è dovuto a mancata osteointegrazione si parla di insuccesso precoce e può essere dovuto ad un surriscaldamento dell'osso durante la preparazione del sito chirurgico, alla mancata stabilità primaria o ad un sovraccarico meccanico precoce.

L'insuccesso tardivo, invece, si configura come insuccesso biomeccanico (frattura dell'impianto), insuccesso estetico (recessione dei tessuti molli con evidenziazione del bordo metallico dell'impianto) oppure come insuccesso biologico, con l'insorgenza di mucosite e/o perimplantite.

1.c Gli impianti dentali

L'impianto dentale è un dispositivo medico-chirurgico, che viene inserito nell'osso e sostiene una protesi fissa o rimovibile, costituita da un dente singolo fino ad un'intera arcata dentaria. Al giorno d'oggi la forma universalmente utilizzata è quella cilindrica, conica o cilindrico-conica, ad imitazione della radice dentale (Fig. 3). Le forme alternative sono state oggi abbandonate, perché non supportate da adeguata letteratura scientifica e perché accompagnate spesso da complicanze rilevanti per il paziente in caso di insuccesso dell'integrazione.

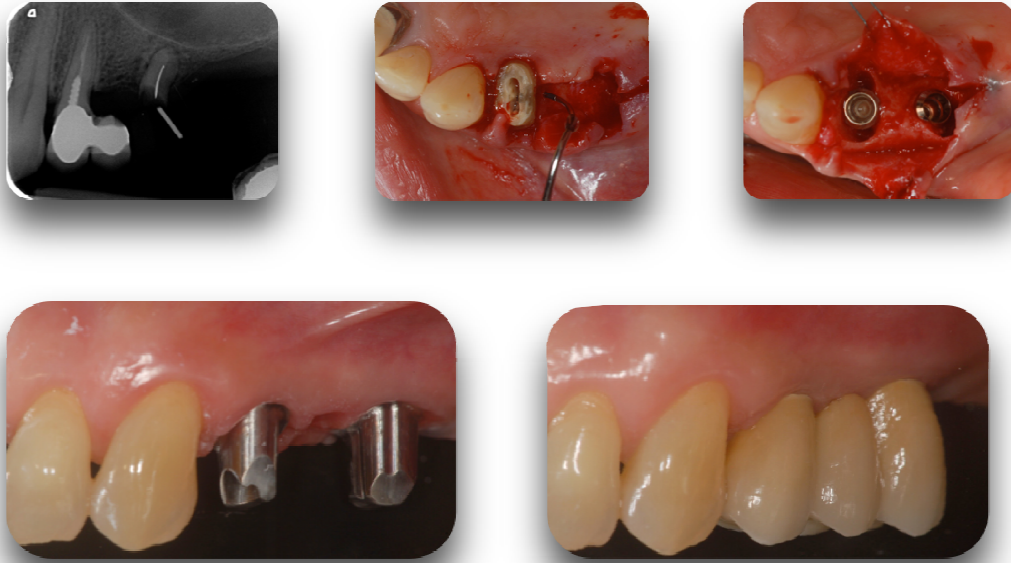


Fig. 3 Sequenza clinica di recupero di una zona edentula tramite impianti osteointegrati e corone in ceramica

Il principale costituente degli impianti dentale è il titanio, uno dei metalli più biocompatibili per il cavo orale. La tipologia commerciale più utilizzata è quella più pura (di grado 4 o CP4), che garantisce un'ottima resistenza alla trazione e riduce al minimo la possibilità di infezione. Si è arrivati ad utilizzare il titanio per gli impianti dentali dopo una serie di esperimenti, durati diversi anni, allo scopo di trovare il materiale più adeguato e resistente, che non causasse infezioni e che fosse, soprattutto, duraturo, richiedendo pochi interventi di manutenzione da parte dell'odontoiatra (Esposito et al., 2014). Negli ultimi tempi si è pensato di sostituire il titanio con la zirconia, materiale più leggero, meno invasivo e ugualmente biocompatibile. Tuttavia, i primi dati suggeriscono una minore resistenza alla disinserzione della fixture e, di conseguenza, una minore durata nel tempo. Inoltre, come ampiamente dimostrato in letteratura, il titanio possiede per sua natura una debole azione battericida (Qin et al., 2014), che contrasta la contaminazione della fixture implantare e contribuisce al successo a lungo termine della riabilitazione protesica.

L'impianto dentale, quindi, è costituito da una parte endossea, o fixture, filettata e provvista di altre ritenzioni accessorie, come scanalature e fori, per aumentare la superficie di contatto con l'osso e, di conseguenza, l'osteointegrazione. I primi impianti avevano una superficie liscia ("machined"). Solo successivamente, per fornire ulteriore ritenzione, le superfici vennero trattate per ottenere una porosità e una rugosità a livello micrometrico e, negli anni più recenti, nanometrico. Uno dei trattamenti più diffusi è il rivestimento con idrossiapatite cristallina degli impianti dentali. L'idrossiapatite cristallina, il principale componente minerale dei denti naturali, dovrebbe favorire con la sua elevata biocompatibilità l'integrazione dell'impianto all'osso circostante. Alcune case produttrici di impianti hanno eseguito diversi tentativi di rivestire a livello macroscopico i loro impianti con molecole dotate di proprietà osteoinduttive come il fosfato di calcio.

Secondo la revisione della letteratura di Bressan et al. esistono metodi di modificazione chimica e fisica delle superfici che possono conferire una nanostrutturazione agli impianti dentali (Bressan et al., 2013b). Tra le prime, l'ossidazione anodica sfrutta l'applicazione di correnti galvaniche per ispessire lo strato di ossidi lungo la superficie dell'impianto. In questo modo si creano modificazioni nell'ordine dei 100 nm. Per ottenere, invece, modificazioni tra i 20 e i 100 nm vengono utilizzati acidi e basi molto forti in combinazione, ad esempio H₂SO₄ ad temperatura costante per un periodo determinato. Modificando i parametri di tempo, temperatura e i soluti utilizzati è possibile ottenere modificazioni sempre differenti e potenzialmente più "accattivanti" per le cellule che devono aderirvi.

A livello di modificazioni fisiche esistono tecniche additive e tecniche sottrattive. Le prime, come lo spray di plasma, consistono nel far depositare finissime particelle sulla superficie implantare. I materiali utilizzati sono di varia natura (Ag, Au, Ti) e possono rivestire una vasta gamma di substrati (metalli, polimeri, ceramiche). Sugli impianti dentali è

il titanio che viene fatto depositare direttamente sulla superficie della fixture. Tra le tecniche sottrattive, invece, la sabbiatura utilizza particelle finissime che vengono fatte collidere con la superficie dell'impianto, creando una porosità di superficie, la cui densità è determinata dalla dimensione delle particelle in collisione. Ad esempio, l'ossido di allumina è uno dei materiali più usati per creare porosità nell'ordine dei 50-200 nm.

La connessione tra la porzione sottogengivale intraossea e la componente protesica del complesso impianto-corona è garantita dall'abutment. Quest'ultimo è un dispositivo che viene fissato alla testa dell'impianto tramite una vite passante. La porzione sopracrestale dell'abutment, di forma conica, serve per l'alloggiamento della corona protesica, tramite un accoppiamento perfetto eseguito in laboratorio dall'odontotecnico. A sua volta la corona può essere cementata sull'abutment, oppure avvitata, oppure ancora può sfruttare la conometria, dove la ritenzione è garantita dall'accoppiamento conico tra abutment e corona, che vengono fabbricate con un angolo di convergenza molto simile.

La tecnica chirurgica di posizionamento implantare può annoverare numerose varianti rispetto alla descrizione originale di Brånemark; varianti che, nel corso degli anni, sono state accompagnate da periodi di successo e periodi meno fortunati. La tecnica originale prevede una serie di passaggi ben prestabiliti e con tempistiche rigorose per arrivare dalla cresta edentula al ripristino funzionale della masticazione. Un'attenta pianificazione pre-operatoria è imprescindibile per determinare la lunghezza e il diametro della fixture da inserire. In caso di severe atrofie è infatti necessario un incremento di tessuto osseo tramite prelievi da sedi intra- ed extraorali e innesti localizzati. Il sito deputato a ricevere la fixture viene preparato tramite una sequenza di frese di diametro crescente e progressivo, per non surriscaldare l'osso, sotto abbondante irrigazione. La fixture viene quindi avvitata a velocità

ridotta per diminuire l'attrito con l'osso circostante. Una vite tappo viene fissata alla testa dell'impianto e la gengiva viene suturata ermeticamente. Dopo un tempo di attesa di sei mesi per favorire l'osteointegrazione, tramite una piccola incisione la vite tappo viene rimossa e viene applicata una vite di guarigione, un cilindro di titanio che serve a creare il cono mucoso per il futuro abutment definitivo. Dopo la completa guarigione dei tessuti molli si può procedere con la fase di protesizzazione, in cui il complesso corona-abutment viene applicato sull'impianto.

Modifiche della tecnica tradizionale comprendono la variazione dei tempi d'attesa, sia tra estrazione del dente e posizionamento implantare, sia tra posizionamento e carico protesico; l'obiettivo degli scostamenti dalla tecnica tradizionale è fornire al paziente un ripristino della funzione più precoce possibile. Per questo motivo, negli anni, sono stati adottati posizionamenti implantari contestuali all'estrazione dentaria, i cosiddetti impianti post-estrattivi, dove si sfrutta l'alveolo vuoto per posizionare un impianto, utilizzando il meno possibile le frese preparatrici e ricercando la stabilità della fixture nel poco osso a disposizione. Le percentuali di successo degli impianti post-estrattivi, secondo la revisione sistematica di Lang et al., è del 98,4% dopo due anni dal carico protesi (Lang et al., 2012). Nel caso degli impianti post-estrattivi il rationale del posizionamento immediato risiede nel limitare il riassorbimento della cresta ossea, la quale, senza lo stimolo dell'elemento dentario in funzione, tende a diminuire in spessore e in altezza. È stato infatti dimostrato che un posizionamento di un impianto post-estrattivo limita il riassorbimento della cresta alveolare (quantificabile tra il 15 e il 35% nel corso del primo anno dopo l'estrazione), consentendo il posizionamento di un impianto di diametro maggiore (e quindi con più superficie disponibile per l'osteointegrazione) rispetto agli impianti che è possibile inserire in creste guarite (Wang & Lang, 2012). La guarigione completa del sito alveolare

conseguente all'estrazione avviene in circa 8-16 settimane. Se in questo periodo di tempo abbiamo la possibilità di sostituire il dente con un impianto riusciremo a prevenire questo riassorbimento. Esiste una classificazione degli impianti post-estrattivi, a seconda del tempo di attesa tra estrazione e posizionamento: gli impianti immediati vengono inseriti al momento dell'estrazione; gli impianti post-estrattivi ritardati sono posizionati 4-8 settimane dopo, quando il tessuto gengivale guarito permette la ricopertura completa del sito chirurgico; gli impianti tardivi sono inseriti 8-16 settimane dopo l'estrazione, in un tessuto più maturo che favorisce la stabilità primaria dell'impianto. Da questa classificazione si desume anche il numero di sedute a cui il paziente viene sottoposto: una seduta per i post-estrattivi immediati; due sedute per i post-estrattivi ritardati (1-estrazione, 2 –inserimento); tre sedute per i post-estrattivi tardivi, se necessitano di incremento osseo.

Un'altra alternativa all'implantologia tradizionale è il tempo di attesa tra il posizionamento della fixture e il carico protesico, ovvero la consegna della corona definitiva.

Il protocollo di Brånemark del '69 diceva che "l'apposizione ossea sulla superficie dell'impianto (osteointegrazione) era possibile unicamente se l'impianto era privo di qualsiasi sollecitazione e la guarigione avveniva in ambiente sommerso e raccomandava delle restrizioni molto selettive.

Il carico precoce era una causa determinante la perdita di osteointegrazione perché "un periodo di guarigione insufficiente incrementava il rischio di mobilità implantare immediata o tardiva". Quindi il periodo di guarigione era stato decretato in minimo 3 mesi per la mandibola e 5-6 mesi per il mascellare. Con questi parametri per 15-20 anni la comunità odontoiatrica considerò "lege artis" i dictat di Brånemark.

Successivamente, i lavori di Brumsky e di Szmukler Moncler dimostrarono che la causa della formazione di tessuto fibroso attorno all'impianto e quindi la mancata osteointegrazione non era l'esposizione al carico

masticatorio, bensì i micromovimenti durante la fase di guarigione (Pilliar et al., 1991, Szmukler-Moncler et al., 1998)

Bisogna distinguere il carico immediato dal carico precoce, ed il carico funzionale o oclusale dal carico non funzionale. Il carico immediato viene effettuato subito dopo l'intervento, ovviamente compatibilmente con la preparazione protesica (entro 48 ore dalla chirurgia), mentre il carico precoce si effettua dopo la riparazione dei tessuti molli (da una settimana a due mesi dall'intervento). Per quanto riguarda il carico non funzionale esso viene effettuato con la preparazione di un provvisorio che non articola con l'antagonista, quindi non è sottoposto alle forze oclusali, ma ha funzioni estetiche e di rimodellamento dei tessuti molli; mentre il carico funzionale o oclusale viene effettuato sempre nei casi di edentulia totale. In base ai pazienti selezionati viene scelta la tecnica più adeguata

1.d La Placca Dentaria

Ogni superficie del corpo è esposta alla colonizzazione batterica. Il rinnovamento delle superfici esposte tramite il processo di esfoliazione contrasta l'accumulo batterico. I denti sono superfici non esfolianti e come tali offrono un ottimo substrato per la deposizione e la proliferazione degli aggregati batterici. L'accumulo è quindi responsabile di patologie quali la carie e la malattia parodontale. A seconda del tipo di batterio e della localizzazione dell'accumulo si possono sviluppare lesioni cariose piuttosto che gengiviti e parodontiti. La proprietà di aderire alle superfici è propria di quasi tutti i batteri e dipende dal tipo di superficie, dall'ambiente più o meno fluido e dal tipo di batterio.

La placca viene definita come un deposito di numerose specie ancora non completamente identificate di batteri, organizzati in una matrice

complessa di polimeri batterici extracellulari e prodotti di essudazione salivare.

I primi reperti di amebe, streptococchi, spirochete e batteri fusiformi vennero ritrovati nel cavo orale di pazienti affetti da malattia parodontale a cavallo tra il diciannovesimo e il ventesimo secolo, la cosiddetta età dell'oro della microbiologia.

Successivamente, nel 1966 viene introdotta da Theilade la prima ipotesi sulla placca batterica, nota come ipotesi della placca non specifica (Theilade et al., 1966). Secondo l'Autore, l'accumulo di batteri nel cavo orale porta ad un danno, indipendentemente dalla tipologia di batterio coinvolto. Solo nel 1979 si giunse all'ipotesi della placca specifica (Loesche, 1979), ovvero alla supposizione che esistessero diversi tipi di placca, con agenti patogeni specifici per le singole patologie. Grazie allo sviluppo di tecnologie di ingrandimento d'immagine si arrivò alla scoperta che sulla superficie del dente appena pulito, in pochi minuti si forma un sottile strato (0,1-0,7 μm) acellulare di glicoproteine di derivazione salivare, la pellicola acquisita. Le glicoproteine salivari sono ricche di aminoacidi che molto probabilmente stabiliscono con la superficie dello smalto legami di tipo elettrostatico. Questa pellicola è priva di batteri ed è da considerare come un fisiologico rivestimento della superficie dentaria. Sulla pellicola acquisita si sviluppa un'aggregazione microbica complessa, caratterizzata dalla secrezione di una matrice adesiva e protettiva che prende il nome di Biofilm. Questa struttura, creata dai batteri anche al di fuori del cavo orale garantisce adesione alle superfici e protezione contro agenti esterni quali, ad esempio, gli antibiotici. Inizialmente, il biofilm è formato da microcolonie di batteri. Successivamente si assiste alla moltiplicazione batterica e alla maturazione del biofilm in una struttura complessa, al cui interno i batteri organizzano un complesso sistema di canalicoli, attraverso cui far fluire l'acqua e le sostanze per l'ulteriore maturazione

del biofilm. I batteri degli strati più profondi possono quindi agire indisturbati a contatto con la superficie dello smalto (Fig. 4).

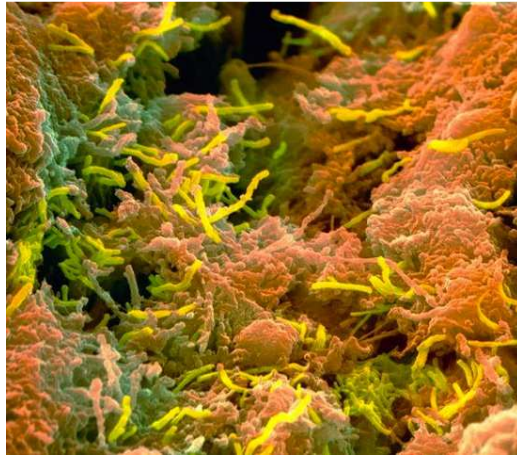


Fig. 4: Placca batterica al microscopio. Sono evidenti numerosi ceppi batterici che testimoniano l'elevata biodiversità della flora patogena all'interno del cavo orale

2. Definizione e Classificazione di Perimplantite

2.a Definizione di Mucosite e Perimplantite

Il legamento parodontale rappresenta la principale differenza tra dente e impianto. Esso, infatti, è un componente essenziale dell'apparato di sostegno del dente, con funzioni di nutrimento, di propriocettività, e di raccolta della sensibilità. L'assenza del legamento parodontale negli impianti dentali rende questi ultimi molto più suscettibili all'attacco batterico, a parità di accumulo di placca (Abrahamsson et al., 1998). I batteri hanno infatti un accesso più diretto all'osso di sostegno e pertanto la diffusione del processo infettivo risulta esacerbata. Per questa ragione le complicanze infettive sono la causa più frequente di insuccesso in implantologia.

La mucosite perimplantare viene definita come una lesione infiammatoria limitata alla mucosa che circonda un impianto dentale (Fig. 5).

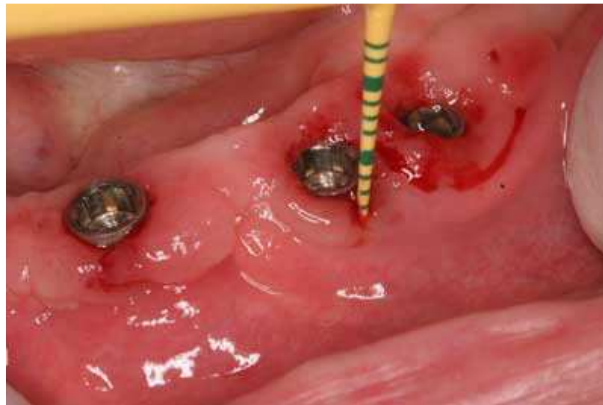


Fig. 5: Mucosite Perimplantare: la sonda parodontale inserita nel solco perimplantare provoca sanguinamento. I tessuti presentano i tipici segni dell'infiammazione (gonfiore, rossore, sanguinamento al sondaggio)

La perimplantite, invece, coinvolge anche l'osso sottostante (Lindhe et al., 2008). Ne deriva che la mucosite è un processo reversibile, mentre la perdita di tessuto causata dalla perimplantite è irreversibile. I segni clinici che si accompagnano alle lesioni perimplantari sono di carattere infiammatorio con un sanguinamento al sondaggio e nei casi più gravi una suppurazione dal solco perimplantare. La presenza di un sondaggio non fisiologico è in funzione dell'estensione della patologia: negli stadi più avanzati di perimplantite, il sondaggio può eccedere i 7-8 millimetri. L'aspetto radiografico è patognomonico: la malattia perimplantare si evidenzia sottoforma di una lesione a "scodella", un cratere osseo che circonda l'impianto, potendo o meno coinvolgere i denti adiacenti (Fig. 6).



Fig.6: Perimplantite. La perdita ossea attorno agli impianti dentali appare evidente

2.b Meccanismi di Distruzione Ossea

Nel cavo orale, la colonizzazione di un substrato (dente, gengiva o impianto) in un ambiente liquido (saliva) si esplica attraverso la formazione di un biofilm, struttura complessa creata dai batteri che si auto-alimenta e crea una nicchia per l'attacco e la crescita di altri batteri. Si può osservare frequentemente un ampio spettro di batteri patogeni all'interno del cavo orale, come *Prevotella Intermedia*, *Prevotella Nigriscens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Treponema Denticola*, *Tannerella Forsythia*. Anche la peri-implantite è un'infezione polimicrobica, ma alcuni autori (Salvi et al., 2008) hanno messo in evidenza che le lesioni attorno agli impianti raccolgono popolazioni batteriche leggermente differenti rispetto alla parodontite. In particolare, lo *Staphylococcus Aureus* ha mostrato un'alta affinità per il titanio e i relativi tessuti peri-implantari. Nel corso di un anno di osservazione l'individuazione o meno del batterio si è tradotta in un valore predittivo positivo (80%) e negativo (90%), rispettivamente.

Per arginare il fronte di avanzamento dei batteri, l'organismo innesca una risposta infiammatoria cronica, che provoca distruzione dei tessuti circostanti e interferenza con la riparazione e la rigenerazione dei tessuti.

Nella patogenesi della malattia parodontale sono stati chiamati in causa diversi mediatori del processo di distruzione ossea, come i metaboliti dell'acido arachidonico, citochine e ossido nitrico (Graves, 2008). Questi mediatori inducono l'osteoclastogenesi e promuovono l'espressione del recettore del fattore di necrosi tumorale 11° (RANK). L'attivazione di quest'ultimo porta alla generazione di numerosi fattori di trascrizione, che up-regolano la biosintesi di citochine pro infiammatorie. Il fattore di differenziazione osteoclastico (RANKL) si lega direttamente al recettore RANK sulla superficie dei pre-osteoclasti e degli osteoclasti maturi favorendone l'attività. Viceversa, l'osteoprotegerina (OPG) è un recettore solubile che antagonizza l'interazione RANK-RANKL, promuovendo indirettamente la formazione di osso tramite inibizione degli osteoclasti. Le citochine pro-infiammatorie e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), oltre al lipopolisaccaride batterico (LPS) aumentano l'espressione di RANKL, mentre riducono la produzione di OPG, portando alla distruzione dell'osso ad opera degli osteoclasti. Gli stessi markers bio-umoralii sono stati evidenziati nella malattia peri-implantare, suggerendo una patogenesi simile nel processo osteolitico (Rakic et al., 2013).

2.c Diagnosi e prevalenza della perimplantite

Non c'è chiarezza nella comunità scientifica sulla diagnosi della malattia peri-implantare. Le conclusioni del *Consensus Report al Seventh European Workshop On Periodontology* affermano che la mucosite peri-implantare è contraddistinta da un sanguinamento al sondaggio (BOP) attorno all'impianto, che può essere accompagnata da rossore e tumefazione dei tessuti molli. Nella perimplantite, invece, la lesione della mucosa è spesso associata a suppurazione e sondaggio aumentato, ma invariabilmente è presente una perdita dell'osso di supporto marginale (Lang et al., 2011). Questa definizione, tuttavia, pone l'attenzione sulle

diverse "soglie", in termini di millimetri, per poter distinguere, sulla base di una radiografia, un fisiologico rimodellamento osseo dalla malattia parodontale. Secondo lo studio di Tomasi e Derks (Tomasi & Derks, 2012), il range dei lavori pubblicati fino al 2012 si estende da 0,4 mm dopo il carico protesico (Koldslund et al., 2010) a più di 5 mm (Zetterqvist et al., 2010). Inoltre, nel *Consensus Report del Working Group 4 al Clinical Research on peri-implant disease* è stato accettato che gli individui che radiograficamente presentano una perdita d'osso perimplantare potrebbero non avere la radiografia alla baseline, rendendo impossibile un vero e proprio confronto e, di conseguenza, una diagnosi univoca (Sanz et al., 2012). Pertanto gli autori suggeriscono una diagnosi basata su criteri più pragmatici e orientati al processo decisionale per scopi terapeutici, piuttosto che meramente radiografici, anche a costo di qualche falso positivo. In assenza di precedenti record radiografici, una perdita verticale di 2 mm dal livello dell'osso marginale atteso, in seguito al fisiologico rimodellamento dopo il posizionamento dell'impianto, può essere considerata come patologica.

Nonostante le varie definizioni proposte siano abbastanza simili, i dati sulla prevalenza e incidenza della perimplantite in letteratura variano notevolmente.

Renvert nel 2012 ha riportato un'incidenza rispettivamente di 32% e 40% in un periodo di 13 anni per impianti a superficie rugosa e a superficie liscia. Non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa tra le due superfici nello sviluppo di perimplantite, definita dagli autori come una perdita di 1 o più millimetri attorno all'impianto accompagnata da sanguinamento al sondaggio, in presenza o meno di suppurazione (Renvert et al., 2012).

Gli studi di Mir-mari et al. nello stesso anno hanno preso in considerazione le perdite di osso superiori alla prima spira (ovvero superiori a 1.2 mm), con sanguinamento o secrezione di pus al sondaggio. Basando l'analisi sul paziente o sull'impianto gli autori hanno

riportato una prevalenza di malattia perimplantare di 9,1% e 16,3%, rispettivamente (Mir-Mari et al., 2012a, Mir-Mari et al., 2012b) .

Infine, secondo un controverso articolo di Zitzmann & Berglundh, la mucosite interessa l'80% dei soggetti e il 50% degli impianti dentali, mentre la perimplantite, identificata come una qualsiasi perdita di osso dopo un anno dal carico dell'impianto, accompagnata dal sanguinamento al sondaggio, è stata identificata tra il 28 e il 56% dei soggetti e tra il 12 e il 43% degli impianti (Zitzmann & Berglundh, 2008).

2.d Classificazione delle perimplantiti

Come risulta chiaro dalla letteratura, la definizione clinica di perimplantite è variabile. Berglundh et al. (Berglundh et al., 2002), ad esempio l'hanno definita come una profondità di sondaggio superiore a 6 mm oppure una perdita di sostanza ossea maggiore di 2,5 mm attorno all'impianto. Ad oggi, tuttavia, la differenziazione tra lesione iniziale ed avanzata è puramente di carattere istologica. Non esistono, invece, dei parametri per differenziare clinicamente gli stadi e la severità della malattia perimplantare. Differentemente, esiste una classificazione per la stadiazione della severità della malattia parodontale cronica, dove si parla di parodontite precoce (sondaggio maggiore di 3 mm), moderata (sondaggio tra 4 e 6 mm) e avanzata (sondaggio superiore a 7 mm). L'utilità di avere una classificazione si estrinseca in un miglior scambio d'informazioni circa la diffusione della patologia all'interno della comunità scientifica, ma, soprattutto, in un maggior controllo sull'efficacia delle terapie proposte. Ad esempio, Koldslund et al (Koldslund et al., 2010) hanno notato che, a seconda della definizione di perimplantite, la prevalenza all'interno di uno stesso studio può variare da 11,3% al 47,1% dei soggetti. Anche Renvert et al. (Renvert et al., 2011) ha ribadito l'importanza di arrivare ad una classificazione comunemente accettata. L'effetto di usare una classificazione non unanime porta ad

un'incidenza variabile tra 16 e il 58%. Per questi motivi Froum e Rosen (Froum & Rosen, 2012) hanno proposto una classificazione, basata sul sondaggio, sulla perdita ossea e su parametri clinici. Il sanguinamento al sondaggio e la suppurazione sono stati scelti come parametri clinici in quanto facilmente oggettivabili dal clinico ed altrettanto facilmente esprimibili attraverso un sistema dicotomico (si/no). Il sondaggio tramite sonda millimetrata è soggetto ad estrema variabilità individuale, a seconda del tipo di sonda e della pressione utilizzata. Inoltre, in presenza di tessuti infiammati, la sonda penetra più in profondità nei tessuti e per evitare sovrastime gli autori suggeriscono di non eccedere gli 0,25 N. Infine, la classificazione proposta dagli autori tiene in considerazione la lunghezza dell'impianto. Infatti, definire perimplantite una perdita d'osso superiore ai due millimetri dopo il primo anno di carico assume una gravità diversa a seconda che si tratti di un impianto lungo 7 mm rispetto ad un impianto lungo 13 mm. Per questo motivo la perdita ossea, misurata tramite confronto di due radiografie endorali eseguite con la tecnica del centratore, viene valutata in termini di percentuale rispetto alla lunghezza dell'impianto.

Pertanto, si parla di perimplantite precoce in presenza di un sondaggio maggiore o uguale a 4 mm, con sanguinamento o suppurazione al sondaggio e una perdita ossea inferiore al 25 % della lunghezza dell'impianto. La perimplantite moderata viene definita come un sondaggio superiore o uguale a 6 mm, con sanguinamento o suppurazione al sondaggio e perdita ossea compresa tra il 25 e il 50 % della lunghezza dell'impianto. Si è, in ultimo, in presenza di perimplantite avanzata quando c'è un sondaggio superiore agli 8 mm, con sanguinamento o suppurazione al sondaggio e una perdita ossea non inferiore al 50 % della lunghezza dell'impianto.

Ogni misurazione viene effettuata su tutti e sei gli aspetti dell'impianto (mesio-vestibolare, vestibolare, disto-vestibolare, disto-linguale, linguale e mesio-linguale). Dal momento che la periimplantite colpisce l'impianto

in ogni suo aspetto, è opportuno riscontrare i segni clinici sopra elencati in almeno due posizioni attorno all'impianto. Infatti, un sondaggio anomalo o un sanguinamento isolato potrebbero essere dovuti ad un fattore locale temporaneo e non a perimplantite.

2.e Implicazioni cliniche delle perimplantiti

Le manifestazioni cliniche della perimplantite sono legate alla gravità della patologia. Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, mucosite e perimplantite non sempre si accompagnano ad una sintomatologia chiara. La mucosite, essendo una lesione di tipo reversibile, non comporta un danno strutturale ai tessuti di supporto dell'impianto. Di conseguenza, il paziente non riferisce mobilità della protesi e le normali attività quotidiane, fonetica e masticatoria, non vengono compromesse. Data la scarsa sintomatologia, tuttavia, la mucosite può evolvere rapidamente in perimplantite, senza che il paziente se ne accorga o riferisce semplicemente un disturbo transitorio. Quando siamo in presenza di perimplantite conclamata, invece, con evidente drenaggio di materiale purulento dai tessuti perimplantari, il paziente riferisce un dolore chiaro e ingravescente nella zona. Se la perdita di osso è marcata, per il protrarsi delle condizioni che avevano creato inizialmente il danno, struttura impianto-corona perde di stabilità, con escursioni orizzontali e verticali e, nei casi più gravi, con espulsione spontanea.

3. Trattamento della perimplantite

3.a Linee guida nel trattamento della perimplantite

Il miglior approccio terapeutico alla mucosite e alla perimplantite consiste nel prevenire la loro comparsa attraverso un attento follow-up

clinico e radiografico dei pazienti portatori di impianti. L'accumulo di placca batterica induce un'inflammatione nei tessuti molli che circondano l'impianto e questo può portare alla distruzione progressiva dell'osso di supporto e, infine, alla perdita dell'impianto. In una recente revisione sistematica della letteratura Atieh e coll. Hanno sottolineato che il programma di mantenimento attorno agli impianti, con controlli regolari, è alla base del successo e consente di ridurre notevolmente l'incidenza di malattia perimplantare. D'altra parte, la rinuncia, da parte del clinico o del paziente, ai controlli periodici incrementa di undici volte il rischio di incorrere in mucosite e perimplantite (Atieh et al., 2013). La prevenzione consiste nell'asportazione dei depositi di placca e tartaro dalla superficie implantare. Rispetto alla terapia parodontale sui denti naturali, la detersione della superficie implantare e della componentistica protesica ha una maggiore complessità, a causa della morfologia non omogenea della superficie implantare. Inoltre, la superficie del titanio ha una durezza inferiore rispetto all'acciaio chirurgico dei normali strumenti parodontali. Matarasso et al (Matarasso et al., 1996) ha dimostrato che strumenti manuali convenzionali (curette e scaler) e ultrasonici creano dei microdanni superficiali, rendendola ruvida e, di conseguenza, maggiormente suscettibile all'adesione batterica. Per questo motivo è opportuno utilizzare strumenti in teflon o titanio, punte di plastica e coppette di gomma morbida.

3.b Terapie proposte

La mucosite è una lesione reversibile, in quanto la rimozione del biofilm batterico è sufficiente per ottenere una completa guarigione. L'uso della clorexidina in collutorio o gel si è dimostrata efficace nel prevenire l'attacco del biofilm batterico, ma è da considerarsi come un coadiuvante del trattamento meccanico (Bressan et al., 2014, Trejo et al., 2006).

La terapia della perimplantite è più articolata e meno supportata da evidenza scientifica. Sono stati studiati molti tipi di interventi singolarmente e in combinazione, ma ancora più varianti cliniche sono utilizzate comunemente nella pratica quotidiana. Tuttavia, se molti interventi diversi vengono combinati tra loro, è difficile discriminare tra quelli realmente efficaci e quelli non. In generale si può dire che gli scopi della terapia siano eliminare l'infezione batterica, arrestare la progressione della lesione e, se possibile, rigenerare l'osso perso migliorando la prognosi dell'impianto stesso.

La terapia della perimplantite comprende la fase non chirurgica e la fase chirurgica. La prima include la detersione dell'impianto con strumenti meccanici, ultrasonici e/o con il laser, sia da soli che in combinazione con antisettici e/o antibiotici. La fase chirurgica, invece, utilizza tecniche resettive e rigenerative (Kotsovilis et al., 2008). Lo studio di Karring et al. ((Karring et al., 2005) ha mostrato che la rimozione dei depositi sottogengivali, ottenuta tramite strumenti ultrasonici o tramite curettes in fibra di carbonio, non è sufficiente da sola alla decontaminazione di tasche peri-implantari ≥ 5 mm. L'uso del laser Er:YAG ha dimostrato una buona efficacia nel trattamento delle perimplantiti, ma i risultati dello studio di Schwarz et al (Schwarz et al., 2005) sono limitati ad un periodo di 6 mesi, suggerendo che la terapia non risolve completamente la lesione, soprattutto nei casi più avanzati. La Clorexidina digluconato (CHX) è un bis-diguanide con carica positiva che aderisce alle superfici caricate negativamente come la mucosa orale, la pellicola acquisita sui denti o le superfici in titanio (Gjerme, 1974) . Il suo effetto antibatterico si esplica sia a livello dei gram positivi che dei gram negativi, come anche su alcuni funghi e virus. Il suo utilizzo sembra giustificato come terapia adiuvante nel trattamento della malattia perimplantare. Tuttavia, il beneficio che deriva dalla sua aggiunta alla terapia meccanica è ancora oggetto di studio, poichè gli studi presenti in letteratura hanno periodi di follow-up troppo brevi ((Kotsovilis et al.,

2008). La clorexidina, infatti, secondo lo studio di Bressan et al. ((Bressan et al., 2014) svolge azione di contrasto alla formazione del biofilm batterico lungo le superfici in titanio, ma, da sola, non è in grado di disgregare l'aggregato batterico. Rispetto alla clorexidina, l'utilizzo di antibiotici locali si è dimostrato più efficace e il risultato è stato mantenuto per 12 mesi (Renvert et al., 2006).

Gli interventi chirurgici, sia di carattere resettivo (Romeo et al., 2005), sia di carattere rigenerativo ((Schwarz et al., 2006) si sono dimostrati efficaci sulla sopravvivenza implantare. Entrambi i tipi di trattamento hanno mostrato un interessante riferimento per la pratica clinica quotidiana, ma la mancanza di dati su altre terapie regenerative rende difficile una comparazione tra le tecniche.

Per concludere, la terapia della perimplantite è un aspetto in costante evoluzione. Non è chiaro quale strategia terapeutica sia la più efficace, in base al tipo e all'estensione della lesion perimplantare.

4. Attualità e sviluppi futuri

4.a Influenza delle superfici sullo sviluppo di perimplantite

I primi impianti dentali osseointegrati avevano una superficie completamente liscia. L'evoluzione di queste superfici, volta alla ricerca di geometrie sempre più performanti, ha portato all'utilizzo di superfici sempre più porose. Negli anni Ottanta si è verificato un rapido sviluppo di superfici rivestite con spray di titanio (TPS) e idrossiapatite (HA), con l'obiettivo di migliorare la performance dell'osteointegrazione. Parallelamente, tuttavia, iniziarono ad emergere le prime problematiche legate a queste superfici, di carattere meccanico come il distacco del rivestimento o di carattere infettivo, come la contaminazione batterica. Negli anni Novanta la ricerca iniziò a concentrarsi sulle dimensioni delle modificazioni da apportare alla superficie implantare, ricercando una

biomimetizzazione con l'ambiente circostante, che favorisce la stabilizzazione del coagulo e quindi l'osteointegrazione.

Le modificazioni, pertanto, sono state attuate non solo a livello macroscopico, ma anche a livello microscopico, prima a livello di microstrutturazione e successivamente a livello di nanostrutturazione. Si è visto infatti (Bressan et al., 2013a) che una superficie nanostrutturata è in grado di influenzare il differenziamento cellulare verso una popolazione di osteoblasti, favorendo così l'osteointegrazione.

Ciò che però da un lato favorisce l'osteointegrazione, dall'altro rende più difficile il recupero di un impianto su cui si sviluppi una perimplantite in quanto i batteri si possono accumulare all'interno delle nicchie sulla superficie implantare rendendo di fatto estremamente difficile la loro rimozione con gli strumenti attualmente a disposizione.

Per questo ed altri motivi alcuni autori (Simion et al., 2014) hanno riproposto l'utilizzo di impianti a superficie liscia, sostenuti da una ricerca scientifica con follow up di più lungo corso.

4.b Correlazione con patologie sistemiche

Esistono poche informazioni sull'associazione tra perimplantite e malattie sistemiche. Alcune revisioni della Letteratura hanno suggerito che le persone affette da diabete mellito sono a rischio di sviluppare perimplantite. Non esistono, tuttavia, degli studi che possano confermare questa percezione, dovuta ad un paragone con la malattia parodontale. Uno studio a breve termine non ha trovato riscontro statistico nell'associazione tra malattie cardiovascolari e problemi con gli impianti dentali (Lee et al., 2010). Un recente articolo ha riportato una comorbilità significativa nei soggetti con malattie cardiovascolari e portatori di impianti dentali o presenza di batteri associati a parodontite (Lachmann et al., 2013).

Nel 2014 Renvert e colleghi (Renvert et al., 2014) hanno condotto uno studio retrospettivo sui fattori sistemici con un possibile collegamento alla perimplantite. Lo studio non è riuscito a dimostrare che malattie come diabete mellito, osteoporosi, artrite reumatoide, e la depressione sono associate con la perimplantite. Ciò può in parte essere spiegato con i tassi di prevalenza bassi di queste malattie nel campione di studio. Il tasso di prevalenza di diabete mellito di tipo II in questo studio è stato, comunque, in linea con quello che ci si può aspettare nella popolazione generale, ovvero circa il 5%. Un totale di sei persone nel gruppo perimplantiti aveva una storia sia di malattie cardiovascolari che di diabete mellito. Sebbene la prevalenza di diabete mellito è stata più alta nel gruppo con perimplantite ($P = 0,09$), lo studio non ha dimostrato un odds ratio di rilievo tra una storia di diabete mellito di tipo II e perimplantiti. Allo stesso modo, lo studio non ha dimostrato una significativa probabilità che le persone con artrite reumatoide siano più a rischio di sviluppare perimplantite. La dimensione del campione esaminato nello studio e la distribuzione degli individui per ogni gruppo sono stati sufficienti per le valutazioni di malattie cardiovascolari, diabete mellito, e l'artrite reumatoide, ma non per l'osteoporosi, le malattie polmonari, la depressione o malattie tumorali.

4.c Genetica e Perimplantite

Lo ricerca clinica ha mostrato che le complicanze implantari, come la perdita di osso di sostegno attorno all'impianto fino alla perdita dell'impianto stesso, non hanno una distribuzione casuale nella popolazione, ma tendono a verificarsi in un sottogruppo della popolazione. Questo porta a pensare che la risposta individuale agli stimoli esterni giochi un ruolo determinante nel successo a lungo termine delle riabilitazioni impianto-protesi ((Fransson et al., 2010, Tonetti, 1999). Nel contesto, il contributo della risposta dell'ospite alla

osteointegrazione rimane poco chiaro. Pertanto, capire il ruolo dei mediatori dell'infiammazione nei tessuti peri-implantari durante periimplantite sarebbe di grande importanza per la prognosi a lungo termine della riabilitazione protesica.

Non è stato ancora chiarito se la suscettibilità genetica dell'ospite determini o meno la suscettibilità a sviluppare complicanze biologiche a carico dell'impianto dentale, anche se è stata sollevata come uno dei potenziali indicatori di rischi (Heitz-Mayfield, 2008). È stato inoltre dimostrato che un paziente che aveva già subito un fallimento implantare aveva una probabilità di 1,3 volte maggiore di perdere un secondo impianto, indicando una selettività dei fallimenti, probabilmente dipendente da fattori sistemici e/o genetici (Weyant & Burt, 1993).

In una recente revisione sistematica (Dereka et al., 2012) sono stati presi in considerazione gli studi che mettevano in relazione i polimorfismi genetici con le complicanze biologiche degli impianti dentali. Gli studi inclusi hanno valutato una serie di polimorfismi. Più in particolare, i polimorfismi sui geni codificanti per IL-1A (-899), IL-1A (3953), IL-1B (-511), IL-1RN (introne 2), IL-2 (-330), IL-6 (-174), TNF- α (G-308A) e TGF- β 1 (C-509T) e (G-800A).

L'analisi dei risultati per IL-1A (-889), IL-1B (3953), IL-1B (-511) e IL-1RN (introne 2) ha fornito evidenza statistica che i pazienti positivi per il genotipo IL-1RN erano a più alto rischio di periimplantite con un odds-ratio di 3 dopo aver aggiustato i dati per fumo, sesso ed età dei pazienti. Per quanto riguarda, invece, IL-1A (-889), IL-1B (3954), i polimorfismi non sono stati associati allo stato di salute peri-implantare.

Gli autori della revisione sistematica hanno concluso che non vi è alcuna associazione evidente tra i polimorfismi genetici specifici (IL-1, IL2, IL-6, TNF- α , TGF- β 1) e le complicanze biologiche degli impianti dentali.

Anche l'interleuchina-22 (IL-22) è stata recentemente descritta in numerose malattie infiammatorie croniche, come la psoriasi e l'artrite

reumatoide. Luo et al. (Luo et al., 2013) hanno dimostrato un'elevata espressione di IL-22 nei tessuti affetti da perimplantite, che potrebbe indurre una produzione aumentata di citochine infiammatorie e avere un ruolo cruciale nella riparazione dei tessuti. Inoltre, gli stessi autori suggeriscono che l'IL-22 potrebbe essere utilizzata come target per una terapia immuno-modulatoria per contrastare il rimodellamento osseo nei soggetti affetti da perimplantite.

4.d Analisi CGH-array

La citogenetica tradizionale consente di identificare un gran numero di anomalie cromosomiche, sia quantitative che qualitative. Il suo limite, tuttavia, è legato al potere di risoluzione del microscopio. L'ibridazione Genomica Comparata (Comparative Genomic Hybridization o CGH), introdotta recentemente tra le tecniche di citogenetica molecolare, ha permesso di evidenziare e caratterizzare sbilanciamenti cromosomici di dimensioni molto ridotte. Questa tecnica, utilizzata inizialmente su metafasi per lo studio delle cellule tumorali, ma si è rivelata utile successivamente per le diagnosi di anomalie cromosomiche in epoca pre- e postnatale.

Si tratta di una ibridazione in situ modificata, che sfrutta la competizione tra due campioni di DNA genomico marcati con fluorocromi diversi: un campione proviene dal paziente, l'altro è DNA genomico di riferimento. Il vantaggio principale risiede nella possibilità di ottenere informazioni sul tipo e sulla localizzazione di aberrazioni cromosomiche, indipendentemente dalla sequenza coinvolta. L'analisi CGH condotta su metafasi, tuttavia, risente di un potere di risoluzione basso (circa 10 Mb). L'utilizzo della piattaforma array (α -CGH), descritta nel 1997, ha aperto la possibilità di una più elevata risoluzione per una migliore rilevazione delle anomalie cromosomiche sbilanciate. La tecnica si basa sugli stessi principi della CGH classica, ma anziché ibridare il DNA campioni e il

DNA di riferimento su preparati metafasici, utilizza piattaforme su cui sono spottati cloni BAC o oligonucleotidi omologhi a loci specifici di ogni singolo cromosoma, fino a comprendere l'intero genoma umano. L'utilizzo di CGH array consente l'individuazione di sbilanciamenti quantitativi di DNA e la precisa posizione del riarrangiamento nel genoma, grazie all'aumento o alla diminuzione del segnale corrispondente alla sonda, in caso, rispettivamente, di amplificazione o delezione della sequenza. Secondo i dati della Letteratura, l'array-CGH si presenta come il metodo più utile per rilevare e localizzare simultaneamente perdita o guadagno di materiale genetico e il suo utilizzo sta aumentando per lo studio delle malattie genetiche (Pinkel et al., 1998).

L'analisi del genoma basata su array permette una risoluzione di circa 100 volte quella del cariotipo. Inoltre, permette di definire esattamente la regione genomica alterata e quindi anche i geni in essa contenuti, migliorando la comprensione delle relazioni esistenti tra variazioni del numero di copie e patologia per una corretta correlazione genotipo-fenotipo.

MATERIALI E METODI

1. Dichiarazione Etica

Tutti i pazienti a cui è stato effettuato il prelievo sono stati adeguatamente informati sul tipo di analisi condotte e hanno firmato il consenso informato

2. Analisi CGH-array

L'Array CGH è stato effettuato con Agilent Human Genome CGH 44K e 180K Microarray Kits (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), aventi una risoluzione di ≈ 75 kb. Colorazione e ibridazione sono state effettuate seguendo le indicazioni del fornitore. Brevemente, dopo aver ottenuto il consenso informato e il sangue dal paziente, si è proceduto a isolare il DNA, successivamente si è proceduto a digerire il DNA del paziente e DNA di controllo (commercial control (Promega, Madison, WI, USA), con enzimi RsaI and AluI per 2 ore a 37°C. Dopo purificazione su colonna, si è proceduto a colorare 1 mg di ogni campione digerito con random priming (Invitrogen) per 2 ore utilizzando Cy5-dUTP per il DNA del paziente, e Cy3-dUTP per il DNA del controllo. I campioni colorati sono stati purificati e trattati a denaturazione e preanniligi con 50 mg of Cot-1 DNA. L'ibridazione è stata effettuata a 65°C in stufa dedicata e in rotazione per 40 h. Dopo 2 fasi di lavaggio, l'array è stato analizzato con scanner Agilent ed analizzato con Feature Extraction software (version 8.0). La rappresentazione grafica è stata ottenuta con CGH analytics software (version 3.1) (Agilent Technologies).

3. Preparazione dei campioni per analisi morfologica

3.a Colorazione ematossilina eosina

I campioni sono stati fissati una notte in formalina al 3.7% a 4°C. L'inclusione in paraffina è stata effettuata con i seguenti passaggi:

- due passaggi in etanolo 50% da 30 minuti;
- tre passaggi in etanolo 70% da 30 minuti;
- due passaggi in etanolo 95% da 30 minuti;
- due passaggi in etanolo 100% da 30 minuti;
- xilene fino alla diafanizzazione;
- due passaggi in paraffina liquida da 1 ora in stufa a 60 °C;
- inclusione.

I campioni inclusi sono stati tagliati in fette dallo spessore di 7 µm, che sono state reidratate attraverso la scala discendente degli alcoli e sottoposte alla colorazione ematossilina eosina.

3.b Fissaggio per immunofluorescenza

Per le analisi di immunofluorescenza i campioni sono stati fissati in formalina per due ore e successivamente disidratati tramite la scala ascendente degli alcoli: i campioni sono stati immersi in soluzioni di alcol etilico a concentrazione crescente (da 50% a 100%) con doppi passaggi da 15 minuti ciascuno, per eliminare gradualmente il contenuto di acqua, prima di passare in xilene fino alla diafanizzazione. Dopo l'inclusione in paraffina i campioni sono stati tagliati in fette dallo spessore di 7 µm e sottoposti alla reazione di immunofluorescenza.

I campioni, dopo due lavaggi in PBS, sono stati trattati per un'ora con una soluzione di Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) al 2% in PBS per ridurre i legami aspecifici degli anticorpi primari. Successivamente i

seguenti anticorpi primari diluiti in BSA al 2% sono stati incubati per una notte a 4°C:

- Rabbit anti Human leptin (Millipore);
- Rabbit anti Human kdel (Sigma);
- Rabbit anti Human von Willebrand Factor (Dako).

Dopo un lavaggio in PBS, i campioni sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi secondari:

Goat anti Rabbit IgG (H + L) TRITC labeled (KPL).

In seguito a un lavaggio in PBS, i nuclei sono stati marcati con Hoechst 33342 (Sigma) 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo un breve lavaggio in PBS, è stato effettuato il montaggio su vetrini portaoggetto con ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen).

Le immagini di immunofluorescenza sono state acquisite al microscopio Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Germania) accoppiato alla telecamera Leica DC500 e al software Leica IM1000 Image Manager v1.20 (Leica, Germania). Le immagini sono state acquisite ad ingrandimenti 40x.

4. Analisi TEM

I campioni lavati in PBS, sono stati fissati con una soluzione di glutaraldeide al 2% in tampone sodio fosfato 0.1 M a pH 7.2 e conservati a 4°C fino al momento della disidratazione. Quest'ultima, preceduta da tre lavaggi in tampone sodio fosfato 0.1 M, è stata eseguita mediante la scala ascendente degli alcoli: i campioni sono stati immersi in soluzioni di alcol etilico a concentrazione crescente (da 20% a 96%) con doppi passaggi da 5 minuti ciascuno, per eliminare gradualmente il contenuto di acqua dai campioni. I campioni sono stati conservati una notte in alcol 96% e dopo un passaggio in alcool assoluto, sono stati sottoposti a fissazione con resina EPON e tagliati all'ultramicrotomo dopo trattamento con acetato di uranile all'1%. I campioni sono stati analizzati al TEM (Electronic Microscopy Service, Department of Biology, University

of Padova, Padua, Italy) Tecnai G12 electron microscope (FEI, acceleration voltage 100 kV). Le immagini acquisite con una Tietz video camera (Tietz Video and Image Processing Systems GmbH, Gauting, Germany) ed analizzati con TIA FEI imaging software (FEI Company, Hillsboro, OR, USA).

5. Estrazione e quantificazione di RNA

L'estrazione di RNA dei campioni è stata effettuata utilizzando una soluzione monofasica a base di fenolo e guanidina isotiocianato, il TRIzol® Reagent (Invitrogen). L'omogeneizzazione dei campioni con tale reagente determina la lisi delle membrane cellulari garantendo l'integrità dell'RNA inibendo l'attività degli enzimi RNasi.

I costrutti sono stati trasferiti in microprovette con 1 ml di TRIzol® Reagent ed incubati per 5 minuti a 30°C per consentirne la completa dissociazione. In seguito, ai campioni sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e sono stati agitati vigorosamente 30 secondi prima della incubazione a temperatura ambiente per altri 2 minuti. Dalla successiva centrifugazione a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C sono state ricavate tre fasi: una fase superiore, acquosa, limpida contenente l'RNA, un'interfase centrale, bianca contenente il DNA e una fase inferiore rosa, contenente proteine, fenolo e cloroformio.

La fase acquosa è stata trasferita in una nuova microprovetta e sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo al fine di precipitare l'RNA. Dopo aver incubato i campioni per 10 minuti a temperatura ambiente, essi sono stati centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Il pellet derivante dalla centrifugazione, costituito dall'RNA, è stato lavato con 1 ml di etanolo 75 % freddo, agitato e centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti a 4°C.

Successivamente l'RNA è stato asciugato a temperatura ambiente per 10 minuti e risospeso in acqua DNase RNase-free.

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata con lo spettrofotometro NanoDrop (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific), il quale, oltre a stimare la concentrazione dei campioni, ne determina la purezza da contaminanti. Lo strumento fornisce i rapporti delle assorbanze 260/280 e 260/230, i cui valori devono essere rispettivamente compresi negli intervalli 1,8-2 e 2-2,2 al fine di reputare i campioni di RNA puri da contaminanti. Valori bassi di tali rapporti indicano la presenza di proteine, fenolo e altri contaminanti organici che assorbono attorno a 280 e 230 nm.

6. Sintesi del DNA complementare

Il DNA complementare (cDNA) è stato sintetizzato seguendo il protocollo Invitrogen: First-Strand cDNA synthesis using M-MLV RT. Tale protocollo prevede l'impiego dell'enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) che, utilizzando il filamento di RNA come stampo, sintetizza un filamento di DNA complementare.

Per ciascun campione sono stati retrotrascritti 500 ng di RNA in un volume di reazione pari a 20 µl. In microprovette nuclease-free sono stati mescolati: 1 µl di Oligo (dT)12-18 [500 µg/ml] (Invitrogen); 500 ng di RNA totale; 1 µl di dNTP Mix [10 mM] (Invitrogen) e acqua distillata nuclease-free fino al volume di 12 µl. Le miscele sono state riscaldate a 65°C per 5 minuti e successivamente poste in ghiaccio per alcuni minuti.

Dopo una breve centrifugata per raccogliere il contenuto sul fondo delle microprovette, sono stati aggiunti: 4 µl di First-Strand Buffer 5X (Invitrogen); 2 µl di DTT [0,1 M] (Invitrogen) e 1 µl di RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor [40 U/µl] (Invitrogen). Le miscele di reazione, dopo essere state mescolate delicatamente, sono state incubate a 37°C per 2 minuti. In seguito, ad ogni campione spipettando delicatamente è stato aggiunto 1 µl dell'enzima M-MLV RT [200 U/µl]

(Invitrogen). Dopo aver incubato i campioni a 37°C per 50 minuti, la reazione è stata inattivata riscaldando i campioni a 70°C per 15 minuti. Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20°C fino al suo impiego come template per l'amplificazione in PCR.

7. Real Time PCR

La Real Time PCR è una versione avanzata della reazione a catena della polimerasi (PCR) che consente, attraverso l'uso di coloranti o sonde fluorescenti, di quantificare in tempo reale l'amplificazione del DNA correlando l'intensità di fluorescenza alla concentrazione dei prodotti di PCR. Ogni reazione di Real Time PCR è caratterizzata da un accumulo di segnale fluorescente che viene definito dal Ct (cycle threshold), cioè dal numero di cicli richiesti per ottenere un'intensità del segnale superiore al rumore di fondo del sistema. A quantità elevate di DNA di partenza corrisponde un veloce incremento del segnale fluorescente e quindi un basso valore di Ct.

Il segnale fluorescente è stato generato aggiungendo alla miscela di reazione il colorante fluorescente SYBR Green I. Si tratta di una cianina asimmetrica intercalante il DNA a doppio filamento. Quando le molecole di SYBR Green I sono libere in soluzione non presentano rilevante fluorescenza; al contrario quando legano il DNA a doppia elica (in corrispondenza del solco minore) esse subiscono un cambio conformazionale ed aumentano considerevolmente la quantità di fluorescenza emessa.

Per ciascun campione sono stati amplificati 2.5 μ l di cDNA in un volume di reazione pari a 25 μ l. In microprovette nuclease-free da 200 μ l sono stati mescolati: 12.5 μ l di FastStart SYBR Green Master [2X] (Roche); 0.75 μ l di Forward primer [10 μ M]; 0.75 μ l di Reverse primer [10 μ M]; 8.5 μ l di acqua Dnasi-Rnasi free (GIBCO). Dopo aver mescolato delicatamente e centrifugato brevemente ogni miscela sono stati aggiunti 2.5 μ l di cDNA.

Le reazioni di Real Time PCR sono state condotte in un termociclatore Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research, Australia), seguendo il programma di amplificazione specificato nella Tabella 1.

Cicli	Passaggio	Temperatura	Tempo
1	Denaturazione iniziale del cDNA	95 °C	10 minuti
40	Denaturazione	95 °C	10 secondi
	Appaiamento dei primers	60 °C	30 secondi
	Estensione	72 °C	30 secondi
1	Estensione finale	72 °C	10 minuti

Tabella 1: Programma di amplificazione della Real Time PCR.

I campioni di cDNA sono stati analizzati in triplice copia utilizzando le coppie di Primers riportate nella Tabella 1.

L'analisi dell'espressione genica è stata determinata normalizzando la quantità del trascritto del gene di interesse con quella di un gene di riferimento (GAPDH) nello stesso campione. La normalizzazione è stata effettuata applicando la seguente formula:

$$2^{\Delta Ct}$$

dove 2 rappresenta l'efficienza di amplificazione pari al 100%,

$\Delta Ct = Ct \text{ gene di riferimento} - Ct \text{ gene interesse}$.

Gene	FOR (5'→3')	REV (5'→3')	Product length (bp)
END	TGTCTCACTTCATGCCTCC AG	GCTCTTTCTTTAGTACCAGG GTCA	161
INS	AGGCTTCTCTACACACC CAAG	CGTCTAGTTGCAGTAGTTCT CCA	199
OCN	GCAGCGAGGTAGTGAA GAGAC	AGCAGAGCGACACCCTA	193
OPG	AAACGCAGAGAGTGTA GAGAGG	TCGAAGGTGAGGTTAGCAT GTC	183
OPN	TGGAAAGCGAGGAGTTG AATGG	GCTCATTGCTCTCATCATTG GC	192
PPAR G	CAGGAGATCACAGAGTA TGCCAA	TCCCTTGTCATGAAGCCTTG G	173
RANK	GATCGGTACAGTCGAGG AAGA	TGCTGCGAGTTGAGGAGT G	169
RANKL	TCAGCATCGAGGTCTCC AAC	CCATGCCTCTTAGTAGTCTC ACA	194
RHOA	TGGACTCGGATTCGTTGC C	ACCTGCTTCCATCCACCTC	183
VEGF	GGACAGAAAGACAGAT CACAGGTAC	GCAGGTGAGAGTAAGCG AAGG	182
VWF	GCTTCACTTACGTTCTGCA TGA	CCTTCACTCGGACACACTC ATTG	174
ZFP467	CGCTGAGCTGAAGTTCTT GGA	ACCACTCTTTCCTGCCCTG	102
GAPD H	TCAACAGCGACACCCA C	GGGTCTCTCTTCTCTTGT G	203

Tabella 2: Primer Forward e Reverse utilizzati nelle analisi di Real Time PCR.

Tabella 3: Geni presenti nel kit Profiler PCR Array

Extracellular Matrix and Cell Adhesion
ECM Components
COL14A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A3, COL5A1, COL5A2, COL5A3, VTN
Remodeling Enzymes
CTSG, CTSK, CTSL2, F13A1, F3 (Tissue Factor), FGA (Fibrinogen), MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, PLAT (tPA), PLAU (uPA), PLAUR (uPAR), PLG, SERPINE1 (PAI-1), TIMP1
Cellular Adhesion
CDH1 (E-cadherin), ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB6
Cytoskeleton
ACTA2 (α -SMA), ACTC1, RAC1, RHOA, TAGLN

Inflammatory Cytokines and Chemokines
CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CD40LG (TNFSF5), CXCL1, CXCL11 (ITAC/IP-9), CXCL2, CXCL5 (ENA-78/LIX), IFNG, IL10, IL1B, IL2, IL4, IL6

Growth Factors
ANGPT1, CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), CTGF, EGF, FGF10, FGF2, FGF7, HBEGF (DTR), HGF, IGF1, MIF, PDGFA, TGFA, TGFB1, TNF, VEGF-A

Signal Transduction
TGFB1, TGFB3, STAT3, CTNNB1, WISP1, WNT5A, MAPK1 (ERK2), MAPK3 (ERK1), PTEN, EGFR, IL6ST (GP130), PTGS2

8. Analisi Statistica

L'analisi dei dati è stata condotta con test ANOVA. Il test di Levene è stato utilizzato per dimostrare omogeneità di varianza tra le variabili. È stato utilizzato un test ANOVA per misure ripetute, con analisi post-hoc, utilizzando comparazione multipla di Bonferroni. Il t-test è stato utilizzato per determinare differenze significative tra i gruppi normalmente

distribuiti (significatività p impostata a $<0,05$). La ripetibilità è stata calcolata come la deviazione standard della differenza tra le misurazioni. Tutti i test sono stati eseguiti utilizzando il software SPSS, versione 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA; licenza dall'Università degli Studi di Padova, Italia).

RISULTATI

1. Aberrazione Cromosomica

L'array CGH è stato utilizzato per analizzare il DNA derivato da campioni di sangue prelevati da 35 pazienti affetti da perimplantite. I risultati ottenuti, riportati in Fig. 1a, dimostrano che tutti i pazienti affetti da perimplantite avevano una duplicazione in eterozigosi (quadrato rosso) di una porzione di genoma corrispondente ad una regione del cromosoma 6, compresa tra la posizione 43.846.044 bp e la posizione 43.862.079 bp, per un totale di circa 16 kb. Al contrario, nell'analisi del DNA derivato da 5 pazienti con impianti non affetti da perimplantite (senza segni clinici di infiammazione da almeno 5 anni) non è stata rilevata alcuna duplicazione (Fig. 7 nel pannello di sinistra). Analisi più approfondite hanno rivelato che questa porzione genomica è situata nell'esone 8 del gene per il VEGF-A.

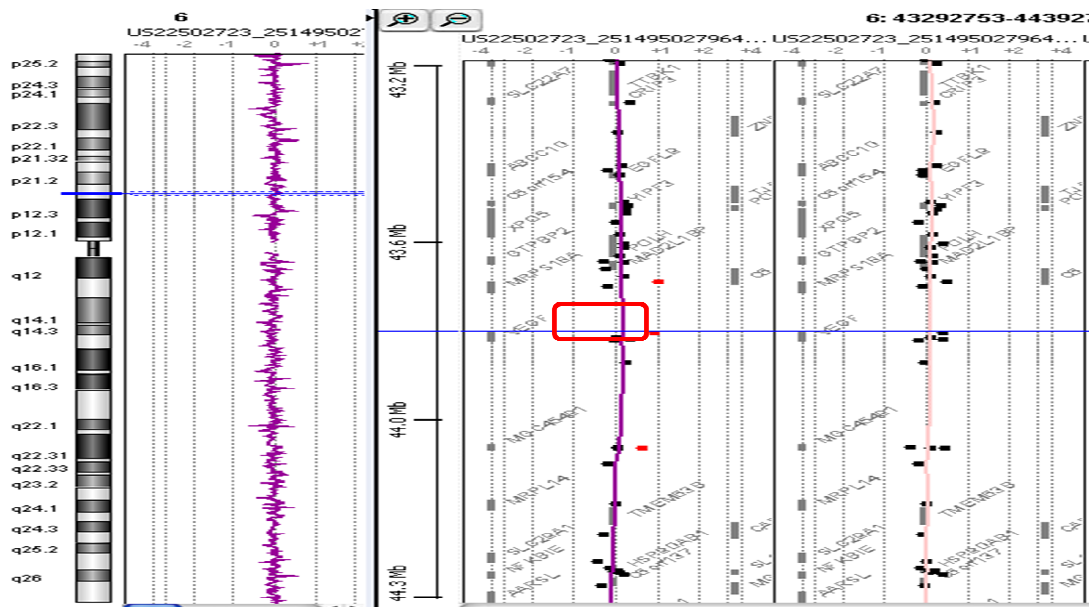


Fig. 7 Cgh-Array dei 5 pazienti con impianti non affetti da perimplantite .
Assenza di duplicazioni nella regione del VEGF

2. Vascolarizzazione

La morfologia e l'espressione genica dei vasi sanguigni presenti nel tessuto affetto da perimplantite sono state analizzate tramite immunoistochimica e TEM. L'analisi morfologica del tessuto con la classica colorazione istologica (Fig. 8a) ha rivelato la presenza di numerosi vasi (cerchio nero) come previsto in un normale tessuto di granulazione. Il tessuto, inoltre, ha mostrato caratteristiche emorragiche con eritrociti sparsi al di fuori dei vasi (freccie nere). L'analisi con microscopio elettronico a scansione (SEM) ha rivelato che la parete endoteliale era irregolare e costellata di piccole formazioni bollose anormali (freccie nere); inoltre, le giunzioni cellulari non erano vicine come normalmente previsto, ma ampi spazi sono stati osservati tra cellule adiacenti (asterischi neri) (Fig. 8b e 8c).

Analisi dettagliate dei marcatori di cellule endoteliali nelle cellule che formano i vasi hanno rivelato che il citoplasma di queste cellule è ricco di fattore di von Willebrand (vWF) (Fig 8d.), che viene prodotto costitutivamente nell'endotelio (nei corpi di Weibel-Palade); tuttavia, non è stata rilevata espressione di CD31, un marker di cellule endoteliali mature (l'assenza di un segnale rosso è abbastanza evidente in Fig 8e.) o VEGF: FKL-1 (Fig 8f.).

Questo comportamento atipico è stato confermato anche a livello di mRNA. L'analisi dell'espressione genica su marcatori legati alla vascolarizzazione, come VEGF, endoglina (END) e vWF, ha rivelato bassi livelli di trascrizioni di VEGF e una down-regulation di endoglina e vWF.

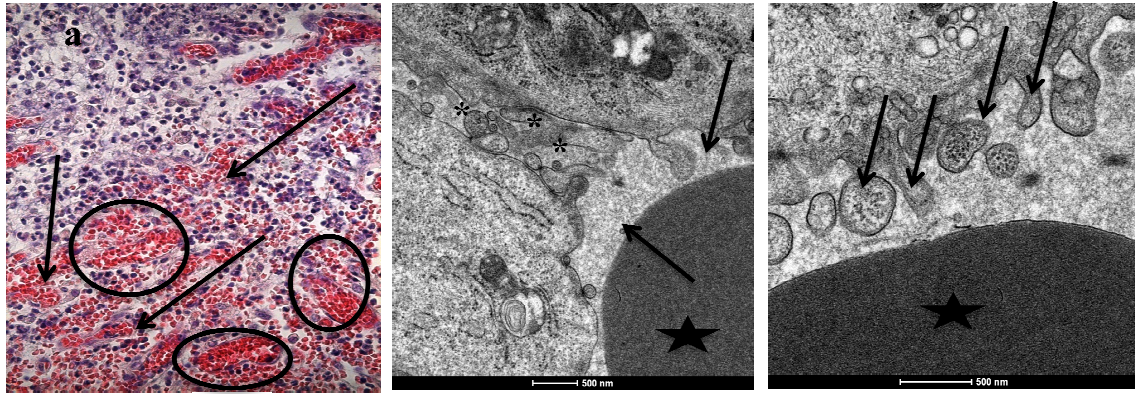


Fig. 8: 8a – Presenza di numerosi vasi, con eritrociti sparsi all'esterno dei vasi; 8b e 8c – Immagini al microscopio elettronico a scansione che mostra fenestrazioni anomale nelle pareti dei vasi e superficie irregolare della parete

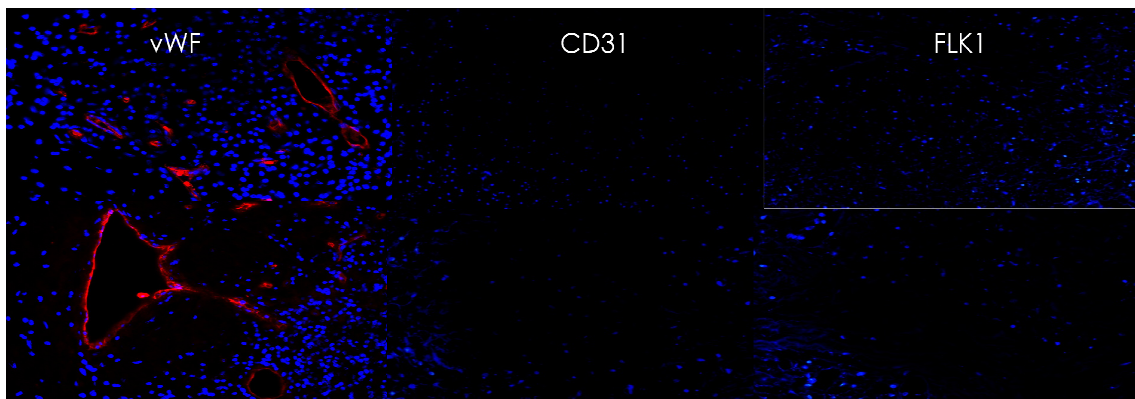


Fig. 8: 8d – Immunofluorescenza mostra notevole espressione di fattore di Von Willebrand; 8e e 8f – Immunofluorescenza che mostra assenza di espressione di CD31 e del recettore per il VEGF FLK-1

3. Processo di guarigione delle ferite

La colorazione istologica dei tessuti affetti da perimplantite (Fig. 9a) ha confermato la presenza di tessuto infiammato, infarcito di polimorfonucleati (PMN) e cellule fagocitiche (freccie nere). Tramite SEM è stata rilevata la presenza di matrice extracellulare degradata (Fig. 9b, freccie nere), unitamente alla presenza di macrofagi al di fuori dei vasi, spiegando direttamente l'attività fagocitica (Fig. 9c, freccie nere). Il processo di guarigione delle ferite dei tessuti con perimplantite è stato analizzato sulla base dell'espressione genica dei componenti della matrice extracellulare: enzimi di rimodellamento, citochine infiammatorie e chemochine.

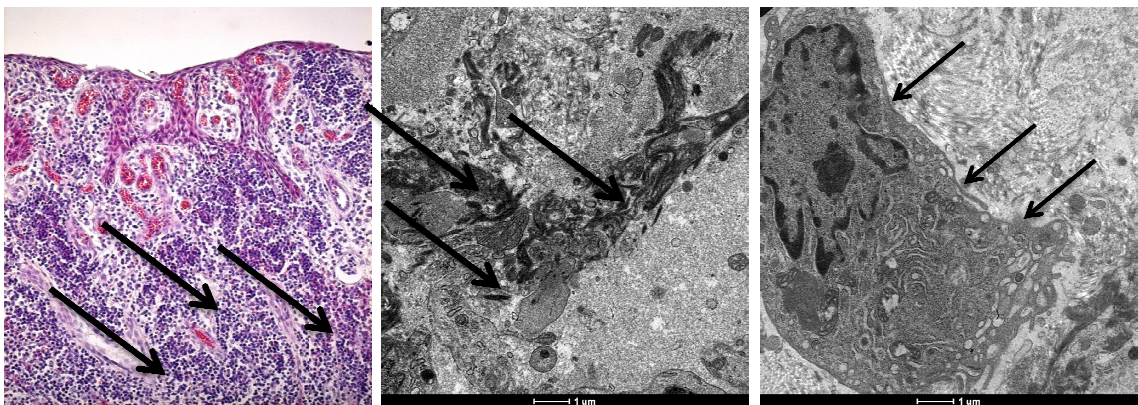


Fig. 9: 9a – Immagine istologica che mostra un tessuto riccamente infarcito di polimorfo nucleati e cellule fagociti che; 9b – Immagine SEM che mostra una porzione di matrice extracellulare degradata; 9c – Immagine SEM che testimonia la presenza di macrofagi al di fuori dei vasi

La fig. 9 (componenti della matrice extracellulare - ECM) mostra chiaramente che alti livelli di collagene di tipo 3 (tipico del tessuto di granulazione, freccia nera) erano presenti nel tessuto peri-implantare, e alti livelli di collagene di tipo 1, tipo 4 e 5, erano altrettanto presenti.

Sono riportati, inoltre, alti livelli di vitronectina (VNT), importante nella promozione dell'osteoclastogenesi. Per quanto riguarda gli enzimi di rimodellamento (Fig. 9e), è stata rilevata una forte sovraespressione di metalloproteinasi della matrice di tipo 1 (MMP1), oltre ad un'elevata espressione di attivatore tissutale del plasminogeno (PLAT), che è una siero-proteasi presente nelle cellule endoteliali, coinvolta nella lisi dei coaguli di sangue. L'analisi di espressione genica delle chemochine e delle citochine infiammatorie (Fig. 9) nei tessuti peri-implantari ha mostrato un'alta espressione di mediatori infiammatori quali interleuchina 6 (IL-6) e 10 (IL-10), oltre a chemochine (C-X-C motif) ligando 2 (CXCL2). Inoltre, sono stati rilevati livelli più bassi di trascrizione di CXCL5, ben noto per avere azione chemotattica e funzioni nell'attivazione dei neutrofili, soprattutto durante le risposte infiammatorie acute.

È stata studiata anche la trasduzione del segnale intracellulare riguardante il tessuto affetto da perimplantite.

È stata osservata la deregolazione di CTNNB1, e una significativa downregulation è stata rilevata anche per Wnt5a, la cui famiglia di geni codifica per proteine di trasduzione del segnale durante i processi di differenziamento nelle cellule mesenchimali. Anche IL6ST, un recettore transmembrana per le citochine, ha mostrato un'elevata espressione genica. Sovraespressione è stata osservata anche per il gene codificante per la cicloossigenasi Ptgs2 (COX), che è un enzima essenziale per la biosintesi delle prostaglandine. Per quanto riguarda l'espressione genica dei fattori di crescita (Fig. 9, i fattori di crescita), Csf 2 e 3 sono risultati sovraespressi. Alti livelli di mRNA sono stati trovati per FGF (fattori di crescita dei fibroblasti) 2, 7, e 10, che sono coinvolti nell'attività miogenica e nella sopravvivenza cellulare in aggiunta ad una serie di processi biologici, tra cui la crescita cellulare, la morfogenesi e la riparazione dei tessuti. Il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) controlla la proliferazione, la differenziazione cellulare, e altre funzioni nella maggior parte delle cellule. La maggior parte dei tessuti analizzati

hanno alta espressione del gene codificante TGF- β , a differenza di altre citochine anti-infiammatorie come IL-10, la cui espressione è minima in tessuti non stimolati e la cui attivazione sembra richiedere l'attivazione da parte di commensali o flora patogena. Il TGF- α , sregolato nei campioni di tessuto, è prodotto da macrofagi, cellule cerebrali, e cheratinociti, e induce lo sviluppo epiteliale.

Il fattore di crescita degli epatociti (HGF) è secreto dalle cellule mesenchimali e agisce come una citochina multifunzionale su cellule di origine prevalentemente epiteliale ed è coinvolto nell'osteoclastogenesi durante i processi di lisi ossea in corso di osteomielite. È stata inoltre rilevata alta sovraespressione del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). PDGF gioca un ruolo importante nella formazione dei vasi sanguigni

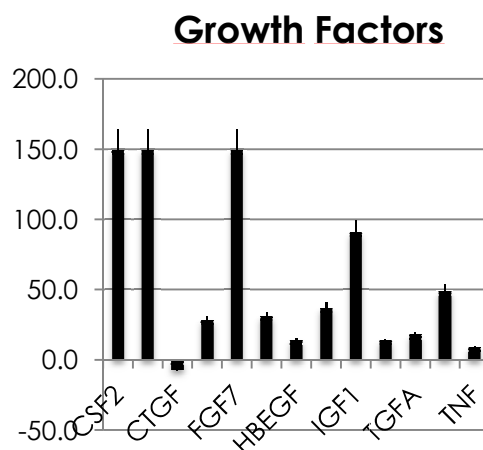
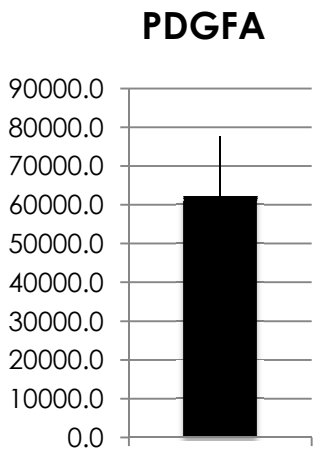
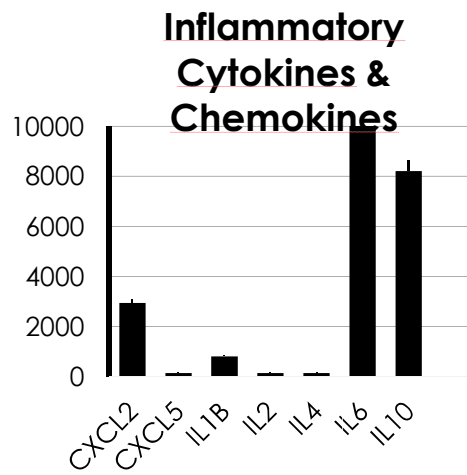
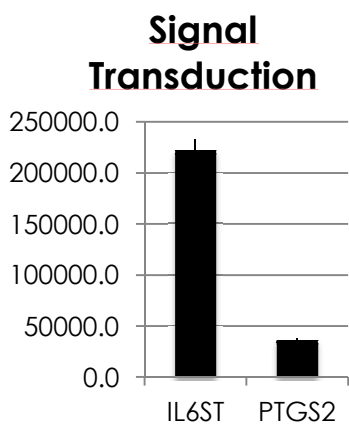
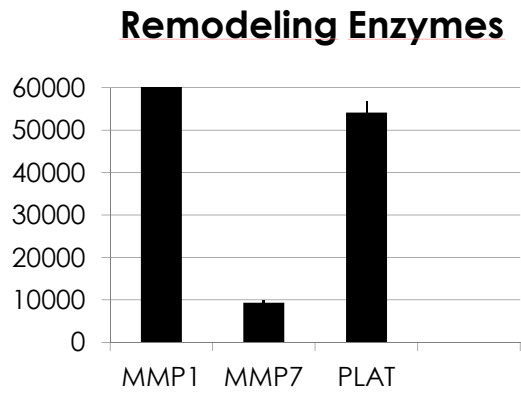
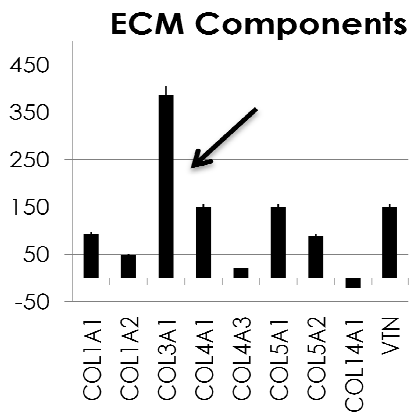


Fig. 9: 9d – 9i Grafici delle diverse concentrazioni ed espressioni di proteine e mediatori nei tessuti analizzati

4. Osteoblastogenesi

L'osteoblastogenesi, l'evento biologico che guida la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali in osteoblasti e poi in osteociti, è stata valutata nel tessuto affetto da perimplantite basandosi sull'espressione genica. Come riportato in Fig. 10a, è stata osservata una downregulation del RUNX (il principale fattore di trascrizione relativo all'osteoblastogenesi), mentre, al contrario, l'osteocalcina (OSC) è risultata sovraespressa. Inoltre, RANK-L era sovraespresso, contrariamente a RANK, debolmente espresso.

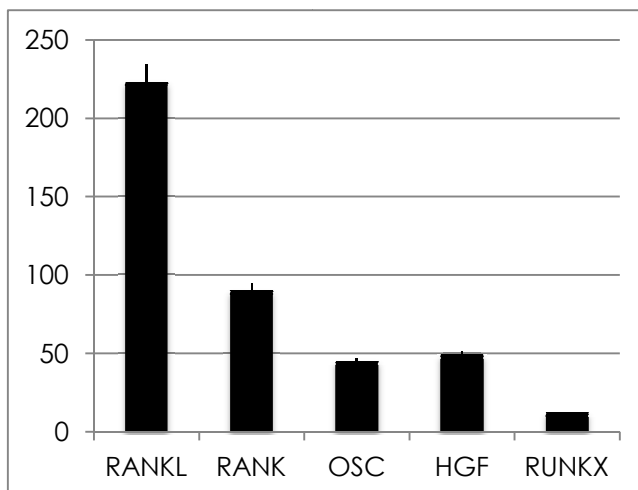


Fig. 10a: Grafico che mostra sottoespressione di RUNX ed espressione di Osteocalcina e RANK-L

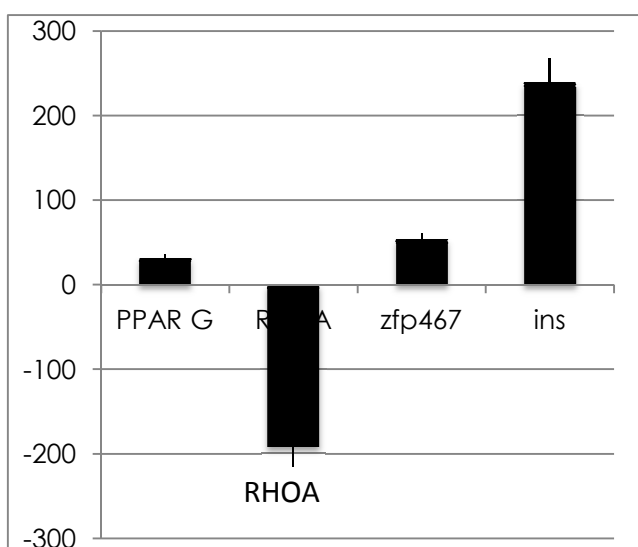


Fig. 10b: Grafico che mostra marcata sottoespressione di RHOA e presenza di Zinc Finger Protein 467 e Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

5. Adipogenesi

La presenza di cellule adipose nei tessuti affetti è stata rilevata dalla classica colorazione istologica (Fig. 11). Il tessuto era formato da cellule con il tipico fenotipo adiposo: forma rotonda, nuclei della base e ampio citoplasma bianco (Fig. 11a.). La colorazione immunohistochimica ha permesso di rilevare leptina (in verde), un ormone del tessuto adiposo (Fig. 11b), che è stata osservata in tutto il tessuto, confermando la capacità delle cellule di secernere questo ormone. Analisi di espressione genica hanno confermato la presenza di cellule adipose. È risultato, infatti, presente il peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), che regola lo stoccaggio degli acidi grassi, il metabolismo del glucosio e l'adipogenesi delle cellule adipose. Inoltre, è stata riscontrata anche una upregulation della zinc finger protein 467 (Zfp467), che è un regolatore del differenziamento verso la linea osteoblastica o adipocitaria. Infine, il metabolismo adiposo funzionale è stato identificato dal rilevamento dell'mRNA di insulina. Come ulteriore conferma della presenza di matrici morbide, atipiche nel campione di studio, abbiamo anche osservato una forte downregulation di RHOA, una proteina specifica fortemente correlata all'attività di mecano-trasduzione (Fig. 10b).

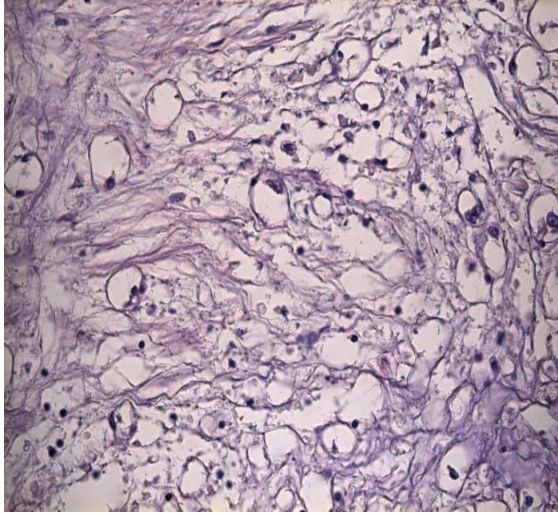


Fig. 11a: Istologia di tessuto perimplantare che mostra la presenza di cellule col tipico aspetto adipocitario

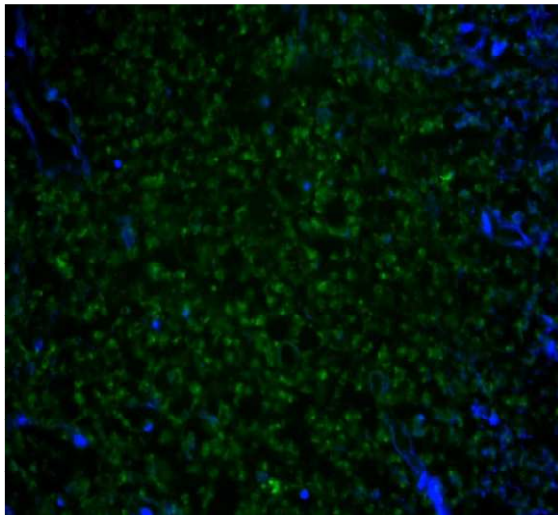


Fig. 11b: Analisi immunoistochimica che dimostra la presenza di leptina (in verde), espressa dalle cellule adipocitarie

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo del presente studio è stato quello di ricercare possibili correlazioni tra squilibri genetici e il processo di osteolisi associato alla perimplantite.

Un'indagine CGH-array, eseguita su pazienti affetti da malattia perimplantare, altrimenti sani, ha rivelato la presenza di una duplicazione nel gene codificante il fattore di crescita endoteliale vascolare-A (VEGF-A) (Fig. 7), in particolare nell'esone 8. La famiglia di proteine VEGF-A regola il flusso di sangue, la crescita e la funzione dei vasi sia nei processi fisiologici, che in quelli patologici. VEGF-A, a seguito di processi di ricombinazione è presente in molteplici isoforme, che possono essere classificate in due sottofamiglie con nuove e più specifiche funzioni. Lo splicing alternativo degli esoni 5-7 del gene VEGF genera forme con attività e biodisponibilità diverse, mentre, selezionando l'esone 8 come sito per uno splicing alternativo, vengono generate proteine pro-angiogeniche, chiamate VEGFxxx, o proteine anti-angiogeniche, chiamate VEGFxxx_b. Nonostante il nome, sono stati individuati dei ruoli importanti per alcune isoforme di VEGF anche in tipi cellulari diversi dalle cellule endoteliali. Sebbene VEGF-A sia convenzionalmente considerato nella famiglia dei vasodilatatori pro-angiogenici e pro-permeabilità, l'identificazione dei suoi effetti su cellule non endoteliali e la scoperta della sottofamiglia anti-angiogenica hanno aggiunto ulteriore complessità nella comprensione dei meccanismi di regolazione microvascolare del VEGF. Nel nostro studio, la duplicazione si è manifestata in eterozigosi e si è rivelata responsabile della down-regulation nella sintesi dell'mRNA, come dimostrato dalla PCR real-time (Fig. 8g). Inoltre, bassi livelli di VEGF-A nel tessuto affetto da perimplantite sono già stati dimostrati da numerosi studi. Nel 1998, Booth e colleghi (Booth et al., 1998) hanno studiato con metodica immunocistochemica gli effetti sulla salute e sulla malattia parodontale del VEGF, raccolto dai

tessuti parodontali umani e dal fluido crevicolare gengivale (GCF); i loro risultati hanno dimostrato che le concentrazioni più elevate di VEGF erano presenti nei siti sani rispetto a quelli malati (Mann-Whitney U-test $p < 0,05$). Successivamente, Cornelini et al. (Cornelini et al., 2001) hanno condotto una valutazione immunohistochimica comparativa su VEGF e densità di microvasi (MVD) in gengiva cheratinizzata e in mucosa perimplantare di impianti falliti. Nei siti sani, le cellule endoteliali che rivestono i vasi hanno sempre espresso VEGF, con elevati livelli di espressione nella maggior parte dei casi. Nei campioni prelevati da perimplantiti, le cellule dell'infiltrato infiammatorio erano positive per il VEGF tra l'80 e il 100% dei casi, e l'intensità VEGF era bassa in tutti i casi. Questi autori hanno concluso che il VEGF probabilmente partecipa sia nella manutenzione della fisiologia parodontale sia nella progressione della malattia infiammatoria perimplantare. Nel 2010, Mierzwinska-Nastalska et al. (Mierzwinska-Nastalska et al., 2010) hanno indagato le concentrazioni di VEGF nel fluido crevicolare gengivale proveniente da tessuti sani e da gengiva che circondava impianti con perimplantite. La perdita ossea è stata esaminata radiologicamente. Le concentrazioni di VEGF sono state valutate tramite enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e sono risultate essere più elevate nel fluido crevicolare nei siti con perimplantite rispetto ai siti clinicamente sani. Recentemente, nel 2012, Matarese (Matarese et al., 2012) ha studiato 90 pazienti e ha trovato una potenziale relazione tra TGF- β e VEGF nella parodontite, con un conseguente nuovo campo di studio per l'osteoinmunologia. In questo studio, gli autori hanno confrontato i profili di espressione proteica di questi mediatori infiammatori in tre gruppi di pazienti: controlli sani, pazienti con parodontite cronica e pazienti con sclerodermia. I loro risultati sottolineano che biomarker come il VEGF giocano un ruolo chiave nello sviluppo della risposta immunitaria, che a sua volta influenza l'instaurarsi e l'evoluzione della malattia.

In quest'ottica abbiamo voluto approfondire se e come il VEGF possa essere coinvolto nel rimodellamento osseo che guida l'attività osteolitica responsabile per la perdita di tessuto osseo intorno agli impianti.

Per determinare se il VEGF è necessario per la riparazione delle ossa, ci siamo ispirati al lavoro di Street et al. (Street et al., 2002). Nel loro lavoro, gli autori hanno inibito l'attività di VEGF durante la guarigione ossea secondaria tramite cartilagine (encondrale) e durante la riparazione ossea diretta (ossificazione intramembranosa) in un modello murino. Essi hanno dimostrato che l'inibizione del recettore del VEGF con fattori solubili (come ad esempio l'uso di anticorpi) è in grado di diminuire non solo il processo di angiogenesi e di formazione di osso, ma anche la mineralizzazione del callo osseo nelle fratture femorali. L'inibizione del VEGF ha anche inibito notevolmente la guarigione di un difetto osseo corticale tibiale, in linea con la nostra scoperta di un ruolo autocrino diretto del VEGF nella differenziazione degli osteoblasti. In esperimenti separati, l'introduzione di VEGF esogeno ha consentito una maggiore formazione dei vasi sanguigni, l'ossificazione e la maturazione del callo osseo nelle fratture di femore sul topo; ha inoltre promosso la riparazione di fratture segmentate del radio sul coniglio.

Alla luce di queste considerazioni, abbiamo effettuato analisi morfologiche dettagliate dei vasi presenti nel tessuto affetto da perimplantite. L'analisi immunohistochimica dello stesso tessuto ha mostrato che i vasi sono costituiti da cellule endoteliali positive per vWF (Fig. 8d), un marker tipico per cellule endoteliali mature, ma, a livello di membrana, non esprimono CD31 (Fig. 8e) né recettori per VEGF (FLK-1) (Fig. 8f). Analisi TEM hanno dimostrato che queste cellule avevano caratteristiche anomale a livello della membrana, con molte bolle sulla membrana plasmatica e alcuni spazi tra le cellule adiacenti (Fig. 8b, C). Questi spazi contribuiscono alla fuoriuscita incontrollata di cellule dai vasi, come le cellule rosse del sangue (Fig. 8a). Tale perdita potrebbe essere fortemente associata con il tipico aspetto emorragico della

perimplantite. Inoltre, attraverso queste lacune, è stato possibile osservare lo stravasamento di macrofagi / neutrofili (Fig. 9a), che contribuiscono ad un aumento del grado di infiammazione nel sito. La forte presenza di citochine infiammatorie, in particolare l'IL-1, che inibisce gli osteoblasti, è cosa nota (Fig. 9c). Hengartner et al. (Hengartner et al., 2013) hanno dimostrato che una prolungata secrezione locale di interleuchina 1 β (IL-1 β) è associata a grave perdita ossea e ritardata guarigione della frattura. Alti livelli di IL-6 (Fig. 9) sono stati associati ad eventi infiammatori e perdita ossea. IL-6 non è solo una citochina pro-infiammatoria; interagisce anche in modo complesso con le cellule coinvolte nel rimodellamento osseo. Nell'artrite reumatoide, IL-6 promuove indirettamente osteoclastogenesi, aumentando il rilascio di RANK-L da parte degli osteoblasti e diminuendo la proliferazione degli osteoblasti nelle fasi avanzate di differenziamento (Abdel). Nei tessuti perimplantari che abbiamo analizzato è stata effettivamente rilevata una forte espressione del gene RANK-L (Fig. 10a). Anche Rakic et al. (Rakic et al., 2014) hanno riportato livelli elevati della proteina RANK-L nei campioni di liquido crevicolare perimplantare in pazienti affetti da perimplantite rispetto a pazienti sani. Alla luce di tali risultati, Rakic et al. hanno concluso che i livelli di RANKL riflettono la distruzione del tessuto peri-implantare.

Inoltre, altre prove della maggiore attività degli osteoclasti che inducono direttamente osteolisi sono state fornite nel presente studio dall'elevata espressione di vitronectina (Fig. 9) e HGF (Fig. 10a). Questi dati, insieme alla ridotta espressione di RUNX (Fig. 10a), che guida il differenziamento delle MSC in cellule osteoblastiche, forniscono la prova che nel tessuto perimplantare si verifici un aumento della popolazione osteoclastica ai danni della popolazione osteoblastica. La diminuzione della popolazione osteoblastica è influenzata anche da fenomeni di meccano-trasduzione. L'elevata produzione di MMP (Fig. 9) ha indotto la generazione di un ambiente molto morbido, mentre è necessaria una

matrice extracellulare dura per favorire il differenziamento osteoblastico delle MSC. Questo meccanismo di rilevamento della matrice dipende dalla contrattilità dell'actomiosina, che è in gran parte controllata dal via RhoA / ROCK. La down-regulation di RhoA rilevata mediante PCR Real Time (Fig. 10b) induce il destino delle MSC verso la linea adipogenica, come conferma l'attivazione di PPAR-gamma e Zfp467, entrambi cofattori che promuovono la differenziazione degli adipociti e sopprimono la differenziazione degli osteoblasti. Inoltre, abbiamo anche rilevato l'espressione di insulina (Fig.11a) e leptina (Fig. 11b). Analisi morfologiche hanno confermato la presenza di cellule adipose.

In conclusione, riteniamo che la sottoregolazione di VEGF risultante da una duplicazione nell'esone 8 induca una vascolarizzazione anomala del tessuto di granulazione, derivato dal danno infiammatorio del tessuto gengivale intorno agli impianti. Questo tipo di vascolarizzazione induce un ritardo nel processo di riparazione con conseguente aumento dell'osteoclastogenesi rispetto all'osteoblastogenesi nel tessuto osseo circostante, contribuendo all' osteolisi, alla mobilità e infine alla perdita dell'impianto.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrahamsson I, Berglundh T and Lindhe J (1998). Soft tissue response to plaque formation at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clinical oral implants research* **9**: 73-9.
2. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P and Eriksson AR (1986). The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **1**: 11-25.
3. Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM, Jr. and Duncan WJ (2013). The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology* **84**: 1586-98.
4. Berglundh T and Lindhe J (1996). Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *Journal of clinical periodontology* **23**: 971-3.
5. Berglundh T, Persson L and Klinge B (2002). A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal of clinical periodontology* **29 Suppl 3**: 197-212; discussion 232-3.
6. Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS and Paleolog E (1998). Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *Journal of periodontal research* **33**: 491-9.

7. Bressan E, Carraro A, Ferroni L, Gardin C, Sbricoli L, Guazzo R, Stellini E, Roman M, Pinton P, Sivoletta S and Zavan B (2013a). Nanotechnology to drive stem cell commitment. *Nanomedicine* **8**: 469-86.
8. Bressan E, Sbricoli L, Guazzo R, Tocco I, Roman M, Vindigni V, Stellini E, Gardin C, Ferroni L, Sivoletta S and Zavan B (2013b). Nanostructured surfaces of dental implants. *International journal of molecular sciences* **14**: 1918-31.
9. Bressan E, Tessarolo F, Sbricoli L, Caola I, Nollo G and Di Fiore A (2014). Effect of chlorhexidine in preventing plaque biofilm on healing abutment: a crossover controlled study. *Implant dentistry* **23**: 64-8.
10. Buser D, Martin W and Belser UC (2004). Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **19 Suppl**: 43-61.
11. Cinar AB and Schou L (2014). Impact of Empowerment on Toothbrushing and Diabetes Management. *Oral health & preventive dentistry*.
12. Cornelini R, Artese L, Rubini C, Fioroni M, Ferrero G, Santinelli A and Piattelli A (2001). Vascular endothelial growth factor and microvessel density around healthy and failing dental implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **16**: 389-93.

13. Dereka X, Mardas N, Chin S, Petrie A and Donos N (2012). A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications. *Clinical oral implants research* **23**: 775-88.
14. Esposito M, Ardebili Y and Worthington HV (2014). Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *The Cochrane database of systematic reviews* **7**: CD003815.
15. Fiske J, Davis DM, Frances C and Gelbier S (1998). The emotional effects of tooth loss in edentulous people. *British dental journal* **184**: 90-3; discussion 79.
16. Fransson C, Tomasi C, Pikner SS, Grondahl K, Wennstrom JL, Leyland AH and Berglundh T (2010). Severity and pattern of peri-implantitis-associated bone loss. *Journal of clinical periodontology* **37**: 442-8.
17. Froum SJ and Rosen PS (2012). A proposed classification for peri-implantitis. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **32**: 533-40.
18. Gjermo P (1974). Chlorhexidine in dental practice. *Journal of clinical periodontology* **1**: 143-52.
19. Graves D (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology* **79**: 1585-91.
20. Hammerle CH, Bragger U, Burgin W and Lang NP (1996). The effect of subcrestal placement of the polished surface of ITI implants on

- marginal soft and hard tissues. *Clinical oral implants research* **7**: 111-9.
21. Heitz-Mayfield LJ (2008). Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of clinical periodontology* **35**: 292-304.
22. Hengartner NE, Fiedler J, Ignatius A and Brenner RE (2013). IL-1beta inhibits human osteoblast migration. *Molecular medicine* **19**: 36-42.
23. Karring ES, Stavropoulos A, Ellegaard B and Karring T (2005). Treatment of peri-implantitis by the Vector system. *Clinical oral implants research* **16**: 288-93.
24. Koldstad OC, Scheie AA and Aass AM (2010). Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *Journal of periodontology* **81**: 231-8.
25. Kotsovilis S, Karoussis IK, Trianti M and Fourmoussis I (2008). Therapy of peri-implantitis: a systematic review. *Journal of clinical periodontology* **35**: 621-9.
26. Krall E, Hayes C and Garcia R (1998). How dentition status and masticatory function affect nutrient intake. *Journal of the American Dental Association* **129**: 1261-9.
27. Lachmann S, Stehberger A, Axmann D and Weber H (2013). The peri-implant health in patients attending an annual recall program. A clinical and microbiological study in 74 patients from the Tübingen Implant Registry. *Clinical oral implants research* **24**: 1300-9.

28. Lang NP, Berglundh T, Heitz-Mayfield LJ, Pjetursson BE, Salvi GE and Sanz M (2004). Consensus statements and recommended clinical procedures regarding implant survival and complications. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **19 Suppl**: 150-4.
29. Lang NP, Berglundh T and Working Group 4 of Seventh European Workshop on P (2011). Periimplant diseases: where are we now?-- Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology* **38 Suppl 11**: 178-81.
30. Lang NP, Pun L, Lau KY, Li KY and Wong MC (2012). A systematic review on survival and success rates of implants placed immediately into fresh extraction sockets after at least 1 year. *Clinical oral implants research* **23 Suppl 5**: 39-66.
31. Lee HJ, Kim YK, Park JY, Kim SG, Kim MJ and Yun PY (2010). Short-term clinical retrospective study of implants in geriatric patients older than 70 years. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **110**: 442-6.
32. Lindhe J, Meyle J and Group DoEWoP (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology* **35**: 282-5.
33. Loesche WJ (1979). Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *Journal of dental research* **58**: 2404-12.

34. Luo Z, Wang H, Sun Z, Luo W and Wu Y (2013). Expression of IL-22, IL-22R and IL-23 in the peri-implant soft tissues of patients with peri-implantitis. *Archives of oral biology* **58**: 523-9.
35. Matarasso S, Quaremba G, Coraggio F, Vaia E, Cafiero C and Lang NP (1996). Maintenance of implants: an in vitro study of titanium implant surface modifications subsequent to the application of different prophylaxis procedures. *Clinical oral implants research* **7**: 64-72.
36. Matarese G, Isola G, Anastasi GP, Favalaro A, Milardi D, Vermiglio G, Vita G, Cordasco G and Cutroneo G (2012). Immunohistochemical analysis of TGF-beta1 and VEGF in gingival and periodontal tissues: a role of these biomarkers in the pathogenesis of scleroderma and periodontal disease. *International journal of molecular medicine* **30**: 502-8.
37. Mierzwinska-Nastalska E, Lomzynski L, Jaworska-Zaremba M and Kostrzewa-Janicka J (2010). Vascular endothelial growth factor in gingival crevicular fluid around dental implants. *European journal of medical research* **15 Suppl 2**: 88-91.
38. Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castellon E and Gay-Escoda C (2012a). Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. *Journal of clinical periodontology* **39**: 490-4.
39. Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Valmaseda-Castellon E and Gay-Escoda C (2012b). Long-term marginal bone loss in 217 machined-surface

- implants placed in 68 patients with 5 to 9 years of follow-up: a retrospective study. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **27**: 1163-9.
40. Musacchio E, Perissinotto E, Binotto P, Sartori L, Silva-Netto F, Zambon S, Manzato E, Corti MC, Baggio G and Crepaldi G (2007). Tooth loss in the elderly and its association with nutritional status, socio-economic and lifestyle factors. *Acta odontologica Scandinavica* **65**: 78-86.
41. Papadaki E and Anastassiadou V (2012). Elderly complete denture wearers: a social approach to tooth loss. *Gerodontology* **29**: e721-7.
42. Pilliar RM, Deporter DA, Watson PA and Valiquette N (1991). Dental implant design--effect on bone remodeling. *Journal of biomedical materials research* **25**: 467-83.
43. Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW and Albertson DG (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature genetics* **20**: 207-11.
44. Pjetursson BE, Sailer I, Zwahlen M and Hammerle CH (2007). A systematic review of the survival and complication rates of all-ceramic and metal-ceramic reconstructions after an observation period of at least 3 years. Part I: Single crowns. *Clinical oral implants research* **18 Suppl 3**: 73-85.

45. Qin H, Cao H, Zhao Y, Zhu C, Cheng T, Wang Q, Peng X, Cheng M, Wang J, Jin G, Jiang Y, Zhang X, Liu X and Chu PK (2014). In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials* **35**: 9114-25.
46. Rakic M, Lekovic V, Nikolic-Jakoba N, Vojvodic D, Petkovic-Curcin A and Sanz M (2013). Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clinical oral implants research* **24**: 1110-6.
47. Rakic M, Struillou X, Petkovic-Curcin A, Matic S, Canullo L, Sanz M and Vojvodic D (2014). Estimation of bone loss biomarkers as a diagnostic tool for peri-implantitis. *Journal of periodontology* **85**: 1566-74.
48. Renvert S, Aghazadeh A, Hallstrom H and Persson GR (2014). Factors related to peri-implantitis - a retrospective study. *Clinical oral implants research* **25**: 522-9.
49. Renvert S, Lessem J, Dahlen G, Lindahl C and Svensson M (2006). Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology* **33**: 362-9.
50. Renvert S, Lindahl C and Rutger Persson G (2012). The incidence of peri-implantitis for two different implant systems over a period of thirteen years. *Journal of clinical periodontology* **39**: 1191-7.

51. Renvert S, Polyzois I and Claffey N (2011). How do implant surface characteristics influence peri-implant disease? *Journal of clinical periodontology* **38 Suppl 11**: 214-22.
52. Romeo E, Ghisolfi M, Murgolo N, Chiapasco M, Lops D and Vogel G (2005). Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part I: clinical outcome. *Clinical oral implants research* **16**: 9-18.
53. Salvi GE, Furst MM, Lang NP and Persson GR (2008). One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clinical oral implants research* **19**: 242-8.
54. Sanz M, Chapple IL and Working Group 4 of the VEWoP (2012). Clinical research on peri-implant diseases: consensus report of Working Group 4. *Journal of clinical periodontology* **39 Suppl 12**: 202-6.
55. Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E and Becker J (2006). Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide). A case series. *Journal of clinical periodontology* **33**: 491-9.
56. Schwarz F, Sculean A, Rothamel D, Schwenzer K, Georg T and Becker J (2005). Clinical evaluation of an Er:YAG laser for

- nonsurgical treatment of peri-implantitis: a pilot study. *Clinical oral implants research* **16**: 44-52.
57. Simion M, Gionso L, Grossi GB, Briguglio F and Fontana F (2014). Twelve-Year Retrospective Follow-Up of Machined Implants in the Posterior Maxilla: Radiographic and Peri-Implant Outcome. *Clinical implant dentistry and related research*.
58. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA and Filvaroff EH (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9656-61.
59. Szmukler-Moncler S, Salama H, Reingewirtz Y and Dubruille JH (1998). Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: review of experimental literature. *Journal of biomedical materials research* **43**: 192-203.
60. Tavares M, Lindefjeld Calabi KA and San Martin L (2014). Systemic Diseases and Oral Health. *Dental clinics of North America* **58**: 797-814.
61. Theilade E, Wright WH, Jensen SB and Loe H (1966). Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *Journal of periodontal research* **1**: 1-13.
62. Tomasi C and Derks J (2012). Clinical research of peri-implant diseases--quality of reporting, case definitions and methods to

- study incidence, prevalence and risk factors of peri-implant diseases. *Journal of clinical periodontology* **39 Suppl 12**: 207-23.
63. Tonetti MS (1999). Determination of the success and failure of root-form osseointegrated dental implants. *Advances in dental research* **13**: 173-80.
64. Trejo PM, Bonaventura G, Weng D, Caffesse RG, Bragger U and Lang NP (2006). Effect of mechanical and antiseptic therapy on peri-implant mucositis: an experimental study in monkeys. *Clinical oral implants research* **17**: 294-304.
65. Wang RE and Lang NP (2012). Ridge preservation after tooth extraction. *Clinical oral implants research* **23 Suppl 6**: 147-56.
66. Weyant RJ and Burt BA (1993). An assessment of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. *Journal of dental research* **72**: 2-8.
67. Zetterqvist L, Feldman S, Rotter B, Vincenzi G, Wennstrom JL, Chierico A, Stach RM and Kenealy JN (2010). A prospective, multicenter, randomized-controlled 5-year study of hybrid and fully etched implants for the incidence of peri-implantitis. *Journal of periodontology* **81**: 493-501.
68. Zitzmann NU and Berglundh T (2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of clinical periodontology* **35**: 286-91.