

ANALISI CLINICA, RADIOGRAFICA E MOLECOLARE DEL RAPPORTO TRA IL MARGINE DI UN RESTAURO DI SECONDA CLASSE ED I TESSUTI PARODONTALI: STUDIO DI COORTE PRE-POST

Crystal Marruganti¹, Nicola Discepoli², Francesco Santoro³, Raffaele Mirra², Gianni Pozzi³, Marco Ferrari², Simone Grandini²

¹ *Studente del CdLM Odontoiatria e Protesi Dentaria, Università degli Studi di Siena*

² *Dipartimento di Biotecnologie Mediche, U.O.C. Odontostomatologia, Università degli Studi di Siena*

³ *Dipartimento di Biotecnologie Mediche, LAMMB (Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia), Università degli Studi di Siena*

Corrispondenza: marruganti@gmail.com

Abstract

Introduction: the aim of the present study is to evaluate, by means of clinical, radiographical and molecular variables, tissue reactions of the proximal and deep periodontium following the placement of a proximal/subgingival restoration. **Materials and Methods:** 41 patients requiring a proximal/subgingival restoration were included in the study. Clinical (probing pocket depth- PPD, recession-REC, bone sounding- BS, plaque, bleeding on probing- BoP) and radiographical (linear distance from the most apical margin of the restoration to the coronal margin of the bone crest- R-Bc) variables were registered. Gingival crevicular fluid (GCF) was then sampled from the site to be restored (site Test) and the intact contralateral tooth (site Control). A quantitative analysis of interleukin-1 α (IL-1 α), tumor necrosis factor α (TNF α) and RANK ligand (RANKL) was carried out. Patients were monitored at 3 (T₃) and 6 (T₆) months after the restoration. **Results:** Statistically significant differences were found for PPD, BS, BoP and R-Bc between baseline and T₆. Intracrevicular levels of IL-1 α and TNF α increased significantly. **Conclusion:** the placement of proximal/subgingival restorations resulted in an increase in PPD, BS, BoP and R-Bc as well as in an increase in the concentration of IL-1 α and TNF α .

Abstract

Introduzione: lo scopo del presente studio è valutare, tramite variabili cliniche, radiografiche e molecolari, le reazioni tissutali del parodonto marginale e profondo, in seguito al posizionamento di

un margine restaurativo iuxta/subgengivale. Materiali e Metodi: 41 pazienti con carie iuxta/subgengivale sono stati inclusi nello studio. Oltre ai parametri clinici (Profondità di sondaggio-PPD, Recessione-REC, sondaggio transcrevicolare- BS, placca, sanguinamento al sondaggio-BoP) e radiografici (distanza tra il margine più apicale del restauro ed il margine coronale della cresta ossea- R-Bc), un prelievo di fluido crevicolare gengivale (GCF) è stato effettuato sia nel sito da restaurare (sito Test) che nel dente controlaterale intatto (sito Controllo). Una analisi quantitativa di interleuchina-1 α (IL-1 α), fattore di necrosi tumorale α (TNF α) e RANKL sarà poi effettuata. I pazienti saranno seguiti dopo 3 (T₃) e 6 mesi (T₆) dal restauro. Risultati: Differenze statisticamente significative sono state rilevate tra il baseline ed il T₆ per PPD, BS, BoP e R-Bc. I livelli di IL1- α e TNF α sono incrementati in modo significativo in seguito al posizionamento del restauro. Conclusione: Il posizionamento di margini iuxta/subgengivali è risultato in un incremento di PPD, BS, BoP e R-Bc oltre che nell'aumento di concentrazione di alcune citochine pro-infiammatorie.

Introduzione

La parodontite è una malattia cronico-infiammatoria ad eziologia multifattoriale; è caratterizzata dalla progressiva distruzione dei tessuti di supporto del dente (Papapanou2018).

Il termine utilizzato per descrivere la dimensione apico-coronale del tessuto molle che circonda i denti è *ampiezza biologica* (BW) (Gargiulo1961). E' stato osservato che l'altezza del tessuto connettivale sovracrestale (SCTA, Workshop EFP/AAP, Chicago 2018) varia entro limiti stretti (1.06-1.08mm). L'epitelio giunzionale (JE) ed il solco, al contrario, sono estremamente variabili; la loro dimensione dipende dall'inclinazione del dente, forma della corona, fenotipo (Jepsen2018), morfologia della cresta e fattori ambientali (Schmidt2013). E' perciò una struttura modificabile, oltre che altamente variabile al livello intra- ed inter-individuale.

Nonostante la vera dimensione di BW possa essere misurata solo istologicamente (Vacek1994; Xie2007), possiamo individuare clinicamente l'altezza dell'unità dento-gengivale con il sondaggio transcrestale (Greenberg1976) o con radiografia standardizzata (Ercoli2018). La media dei valori di SCTA in letteratura è 2.15-2.30mm (Schmidt2013).

I tessuti che compongono la SCTA non sono però definibili indipendentemente in termini volumetrici; per questo motivo nella *nuova classificazione delle malattie parodontali e peri-*

implantari del 2018, il termine BW è stato sostituito con *attacco tissutale sopracrestale* (Jepsen2018).

Oltre all'influenza di molti fattori di rischio (Kinane2006), il posizionamento di margini protesici o restaurativi al di sotto del margine gengivale può costituire una *condizione acquisita* (Jepsen2018) che influenza la storia naturale della malattia parodontale (Matthews&Tabesh 2004).

Studi clinici (Lang1983; Schatzle2001) e preclinici (Parma-benfenati1986) supportano l'inviolabilità dell'attacco tissutale sopracrestale. Uno studio di coorte prospettico con 26 anni di follow-up ha dimostrato come i siti con margini subgengivali mostrassero livelli di infiammazione gengivale più elevati ed una maggiore perdita di attacco rispetto ai siti che non presentavano restauri, oppure presentavano restauri a minimo 1 mm dal margine gengivale (Schatzle2001). Lang e collaboratori hanno osservato come la presenza di margini debordanti favorisse una maggiore colonizzazione da parte di batteri parodontopatogeni (Lang1983). Tale shift nella composizione del microbiota subgengivale può condurre alla perdita di supporto parodontale.

I modelli preclinici supportano tali conclusioni; forniscono inoltre l'evidenza istologica di come l'infiammazione cronica causata dall'invasione dell'attacco tissutale sovracrestale provochi il rimodellamento del SCTA e della cresta ossea, e quindi una migrazione apicale dell'intero complesso (Parma-Benfenati1986).

Clinicamente possiamo misurare l'infiammazione dei tessuti gengivali tramite il parametro Bleeding on Probing (BoP) (Ainamo&Bay1975). La sua assenza costituisce un indice di stabilità parodontale con un valore predittivo negativo elevato (98,5%) (Lang1990).

Passando da una condizione di salute parodontale (Lang2018) ad una di gengivite (Murakami2018) o parodontite, ha luogo un processo di distruzione tissutale che è diretta conseguenza del rilascio di citochine pro-infiammatorie con effetti catabolici, tra cui IL-1 α e TNF α (Birkedal-Hansen1993; Offenbacher2007; Madureira2018).

Il riassorbimento osseo operato dagli osteoclasti è mediato, oltre che dall'interazione tra il ligando del recettore attivatore del fattore nucleare NF-kB (RANKL) ed il suo recettore RANK (Bostanci2007), anche dalla stimolazione sinergica da parte di IL-1 α ed altri mediatori (Rasmussen2000).

La risposta immunitaria in atto è riflessa dalle variazioni delle loro concentrazioni nel fluido crevicolare gengivale (GCF).

Il prelievo di GCF rappresenta perciò un metodo non invasivo per lo studio delle condizioni parodontali a partire dai markers coinvolti nell'infiammazione tissutale e nel rimodellamento osseo (Barros2015; Bostanci2018).

Molti studi hanno di recente proposto la tecnica di rilocazione del margine cervicale (CMR); essa consiste nell'elevare un margine al livello sopragengivale tramite il posizionamento di uno strato di resina diretta composita (Dietschi1998). Pochi dati sono disponibili riguardo l'impatto di tali tecniche sui parametri biometrici parodontali nel tempo (Ferrari2018).

Inoltre, nessuna evidenza è presente in letteratura riguardo come la distanza radiografica dal margine di un restauro interprossimale alla cresta ossea influenzi l'entità del rimodellamento tissutale attorno al dente, e come questo sia relazionato alle variabili cliniche dei tessuti e molecolari del GCF.

Il primo obiettivo del presente studio sarà di valutare, tramite variabili *cliniche, radiografiche e molecolari*, le reazioni tissutali del parodonto, in seguito al posizionamento di un margine restaurativo iuxta/subgengivale. Un secondo obiettivo sarà quello di valutare l'impatto che la vicinanza del restauro con la cresta ossea ha in termini di stabilità dei tessuti.

Materiali e Metodi

Il presente studio di coorte prospettico pre-post è condotto presso i Reparti di Conservativa e Parodontologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Senese ed approvato dal Comitato Etico Regione Toscana Area Vasta Sud Est (numero: 15860).

Arruolamento pazienti e criteri di eleggibilità

La coorte di pazienti sarà definita da coloro che afferiranno ai reparti suddetti e verranno selezionati in maniera consecutiva. I pazienti risulteranno eleggibili in base ai seguenti criteri di inclusione:

- Presenza di carie iuxtagengivale/subgengivale
- Assenza di malattia parodontale attiva
- Consumo di massimo 10 sig/die

- Buono stato di salute generale
- Capacità e volontà di dare un consenso scritto

I criteri di esclusione comprenderanno:

- Assunzione di farmaci antiaggreganti e/o anticoagulanti
- Assunzione di farmaci immunosoppressori
- Gravidanza

In seguito all'accettazione e comprensione del protocollo da parte dei pazienti, ed alla firma del consenso informato (Dichiarazione di Helsinki), si definirà la coorte finale di pazienti inclusi.

Raccolta dati e timeline dello studio

Una volta arruolati i pazienti ed effettuata una anamnesi medica completa, due operatori esperti e calibrati raccoglieranno i parametri biometrici. Verrà eseguita un'analisi di correlazione tra i due esaminatori clinici dello studio (Coefficiente di Correlazione Intraclasse).

Durante il questionario anamnestico, verranno raccolti anche i seguenti dati:

- Abitudine al fumo, tramite valutazione categorica (sì/no/ex);
- Familiarità per malattia parodontale

Ciascun paziente (unità sperimentale) apporterà alla sperimentazione un sito Test (dente con carie iuxta/subgingivale) ed un sito Controllo (dente controlaterale intatto, non trattato).

L'analisi clinica al *baseline* (T₋₁) include la registrazione dei seguenti parametri *sito-specifici* (*sito con necessità di restauro*):

- Profondità di tasca al sondaggio (PPD), effettuato con sonda millimetrata (UNC 15);
- Livello del margine gengivale (REC), con riferimento alla giunzione amelo-cementizia (CEJ);
- Sanguinamento al sondaggio (BoP), tramite valutazione dicotomica (sì/no);
- Presenza di placca (PI), tramite valutazione dicotomica (sì/no);
- Spessore gengivale (GT) nella zona approssimale, rilevato con un file endodontico e misurato con un calibro digitale;
- Sondaggio transcrevicolare (BS), effettuato con sonda millimetrata (UNC 15).

Due parametri *full-mouth* sono inoltre calcolati sei siti per dente (esclusi i terzi molari):

- Full-Mouth Plaque Score (FMPS)
- Full-Mouth Bleeding Score (FMBS)

A partire dal *baseline* e per tutta la durata dello studio, i pazienti arruolati saranno inseriti in un programma di terapia parodontale di supporto con frequenza trimestrale.

Analisi clinica e radiografica (T₀)

Una settimana dopo la valutazione clinica, verrà eseguita una seduta (T₀) in cui, in seguito al prelievo di GCF, un operatore esperto effettuerà il restauro isolando con diga di gomma ed utilizzando adesivi smalto dentinali (Prime & Bond Active, Dentsply Sirona, Germany), matrici sezionali (Palodent V3, Dentsply Sirona, Germany) e resine composite (Ceram.x, Dentsply Sirona, Germany). Il restauro sarà poi lucidato con apposite punte di silicone.

Variabile radiografica

La variabile radiografica consisterà nella misurazione della distanza lineare tra il margine apicale del restauro ed il margine coronale della cresta ossea (R-Bc). Le radiografie verranno standardizzate grazie all'uso di un morso in occlusione ottenuto con un materiale da impronta (Elite HD+ Putty Soft, Zhermack, Germany).

Follow-up

I pazienti verranno controllati nei follow-up a 3 (T₃) e 6 (T₆) mesi.

Durante le visite di controllo saranno effettuate le seguenti misurazioni:

- Prelievo di GCF nei siti Test e Controllo;
- Registrazione dei parametri biometrici (PPD, REC, BOP, PI, BS)
- Esecuzione di una radiografia intraorale standardizzata per misurare la distanza tra il margine più apicale del restauro ed il margine coronale della cresta ossea (R-Bc).

Il parametro radiografico sarà misurato tramite un software apposito di misurazione *ImageJ* (Rasband, U.S. NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Prelievo di fluido gengivale crevicolare (GCF)

Per ogni paziente verranno presi al T₀ i campioni di GCF, uno dal sito Test e l'altro dal sito Controllo. Il GCF sarà analizzato e confrontato intergruppo (siti Test vs Controllo) ed intragrappo.

I siti da cui prelevare il GCF sono stati isolati con dei rulli di cotone e poi asciugati con un getto d'aria per 10s.

Una striscia di carta assorbente (Periopaper®, OraFlow Inc., NY, USA) viene inserita nel solco gengivale fin quando non viene percepita una minima resistenza (Brill 1962) e lasciata in posizione per 30s. Il campionamento viene ripetuto due volte con un periodo di *wash-out* di almeno un minuto.

Analisi GCF

La striscia di carta viene immersa in 100 microlitri di PBS (*phosphate- buffered saline*) contenente una diluizione 1:100 di un mix di inibitori delle proteasi (Sigma- Aldrich), conservata in ghiaccio e consegnata al Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia. Il campione è vortexato per 30 secondi, centrifugato e conservato a -80 °C. L'analisi quantitativa delle citochine IL-1 α , TNF α , RANKL sarà effettuata in duplicato tecnico con un kit Luminex custom (Thermo Fisher) utilizzando un lettore Bio-Plex Magpix Multiplex Reader (BioRad).

Analisi Statistica

Statistica descrittiva: i dati ottenuti dalle misurazioni cliniche e radiografiche verranno espressi come medie ed Intervallo di confidenza (IC-95%). Le variabili dicotomiche e categoriche verranno espresse come frequenza e corrispettivo IC-95% (Intervallo di Wilson). I valori delle concentrazioni di citochine verranno espressi come mediane e IC-95%.

Statistica inferenziale: le variabili quantitative (PPD, REC, BS, R-Bc), dopo la verifica della loro distribuzione normale e della loro omogeneità delle varianze (Test di Shapiro-Wilk e test di Lovene, rispettivamente), verranno analizzate con il test parametrico di ANOVA ad una via per misure intrasoggetto (Test non parametrico di Kruskal-Wallis) ($p < 0,05$) ed il test *post-hoc* di Bonferroni.

La distribuzione delle variabili dicotomiche e categoriche (BOP, PI, Smoking, Familiarità) viene analizzata con il test di simmetria esatto (McNemar) ed il test di Friedman ($p < 0,05$).

Modello di Regressione: viene disegnato un modello di regressione logistica. La variabile binaria "esposizione" chiamata *xraybas* verrà creata a partire dalla misura lineare R-Bc, considerando come valore soglia $R-Bc = 2\text{mm}$ ($R-Bc > 2\text{mm}$, *xraybas* = 0; $R-Bc \leq 2\text{mm}$, *xraybas* = 1). La variabile "risposta" del modello prevede l'assenza a sei mesi di BoP ed un aumento di $PPD > 1\text{mm}$ (differenziale $T_0 - T_6$) e verrà definita "Successo".

Il modello di regressione risulterà statisticamente significativo considerando il valore del rapporto di verosimiglianza (*likelihood ratio*) ($p < 0,05$).

Numerosità campionaria

La numerosità campionaria viene valutata considerando un errore α di 0,05 ed un errore β di 0,80 prendendo una frequenza di BoP=10% come riferimento e considerando una frequenza di BoP=25% come frequenza attesa nella coorte e clinicamente rilevante. La numerosità campionaria rilevata da un software statistico *ad hoc* (Stata IC 15) prevedrà l'inclusione di un totale di 41 pazienti.

Risultati

Sono stati inclusi un totale di 41 pazienti. Le caratteristiche della coorte sono presentate nella tabella 1 (Tab. 1).

Parametri clinici

I valori medi di PPD, REC, BS e R-Bc e le proporzioni dei siti Test PI+ e BoP+ sono illustrati nella Tabella 1.

La presenza di placca nel sito Test (PI+) è rinvenuta in circa ¼ dei siti al T₀ (27%) e tende a rimanere costante per tutta la durata dello studio ($p_{T_0-T_6}= 0.5078$) (Tab. 2).

I siti test BoP+ sono raddoppiati dal T₀ al T₆ ($p_{T_0-T_6}= 0.0018$), con differenze statisticamente significative evidenziabili tra T₀ e T₃ ($p_{T_0-T_3}= 0.0034$), ma non tra T₃ e T₆ ($p_{T_3-T_6}=1.000$).

La profondità di tasca media mostra un incremento di 0.4 mm tra T₀ e T₆ ($p_{T_0-T_6}= 0.0174$). I confronti intragruppo mostrati nella Tabella 2 (Tab.2) evidenziano incrementi statisticamente significativi di BS e R-Bc ad ogni *time point* dello studio. La recessione rimane costante ($p=0,2003$)

Livelli di IL-1 α , TNF α , RANKL

Le mediane delle concentrazioni di IL-1 α , TNF α e RANKL sono mostrate nella tabella 3 (Tab.3).

Il confronto intergruppo per IL-1 α (sito Test vs Controllo) mostra differenze statisticamente significative a T₃ e T₆; il confronto intragruppo mostra invece come nel gruppo Test vi siano incrementi significativi tra T₀ e T₃ e T₆ rispettivamente, ma non tra T₃ e T₆ ($p_{T_3-T_6}= 0.4067$) (Fig.1).

Il confronto intragruppo per TNF α mostra un andamento sovrapponibile a quello di IL-1 α , mentre il confronto intergruppo mostra un incremento significativo tra T₀ e T₆ ($p_{T_0-T_6}= 0.026$) (Fig.2).

Nessuna differenza statisticamente rilevante è stata evidenziata per le concentrazioni di RANKL nei diversi *time points* e tra i diversi gruppi (Fig.3).

Il modello di regressione finale (Tab. 4) considera il fumo, la familiarità e la presenza di placca sul sito sperimentale come variabili di confusione. Il modello proposto risulta statisticamente significativo ($p<0,0153$) con una capacità di interpretare la variabile risposta del 34% (pseudo R²). Nel modello proposto la familiarità alla malattia risulta essere un fattore confondente con una OR statisticamente significativa ($p=0,015$).

Discussione

Nel presente studio, il restauro di seconda classe, eseguito con materiale composito e posizionato iuxta/subgingivalmente, induce una reazione dei tessuti parodontali caratterizzata da aumento di PPD, BoP e BS.

Contestualmente, l'aliquota nel solco gengivale di IL-1 α , TNF α aumenta in maniera significativa a partire dai 3 mesi dall'esecuzione del restauro.

Il modello di regressione logistica, modellato con il fine di valutare l'effetto della posizione del margine restaurativo (esposizione) sulla PPD e presenza di BoP (effetto), non è capace di riscontrare un'associazione positiva tra l'esposizione e l'effetto. Tra i fattori confondenti inseriti nel modello, la familiarità alla malattia parodontale raggiunge un valore statisticamente significativo.

L'ipotesi nulla che ha mosso il disegno del presente studio quasi-sperimentale concerneva la possibilità che materiali restaurativi posizionati oltre il margine gengivale, con elevate performance di biocompatibilità (lucidabilità e precisione), potessero non indurre reazione di infiammazione dei tessuti parodontali marginali/profondi. I risultati ottenuti suggeriscono di dover rifiutare l'ipotesi nulla. Recentemente Collares e collaboratori (Collares2018) hanno pubblicato i risultati di uno studio trasversale con 535 pazienti nei quali veniva analizzata la relazione tra la presenza di un restauro interprossimale sopra/sottogengivale (amalgama e composito) e variabili parodontali surrogate (PPD, CAL, BoP). I risultati ottenuti dal modello di regressione confermano che il margine subgengivale è di detrimento per la salute parodontale, in termini di aumento di PPD e CAL. I restauri effettuati in amalgama si associavano a maggiore PPD rispetto al composito. I risultati di quest'ultimo studio sono concordi con quelli ottenuti nel presente studio clinico.

La seconda ipotesi del presente studio verteva sulla possibilità di stabilire un'analisi diretta tra la vicinanza del margine restaurativo e la cresta ossea, come misura quantitativa della violazione dell'attacco tissutale sopracrestale. Quanto il clinico possa "spingersi" all'interno del solco con il restauro è materia di discussione. Il modello di regressione logistica del nostro studio aveva come finalità quella di stabilire l'impatto che il posizionamento del margine restaurativo ad una distanza maggiore o minore di 2mm dalla cresta ossea avesse nell'ottenere, in assenza di BoP, un minimo approfondimento del solco gengivale ($T_6PPD - T_0PPD < 1mm$). I risultati del modello, anche se suggeriscono che posizionare un margine in composito ad R-Bc > 2mm aumenti la probabilità di ottenere "successo" (OR = 6,5), non raggiungono la significatività statistica ($p = 0,171$). La mancata significatività statistica potrebbe essere giustificata da un ridotto tempo di osservazione (6 mesi). In base alle caratteristiche di progressione della malattia parodontale (Teles2016; Teles2018; Haffajee1991) e considerando le caratteristiche dei pazienti inclusi (bassa frequenza di malattia parodontale pregressa, età, PPD fisiologica in corrispondenza del sito sperimentale) possiamo supporre che l'aumento di PPD oltre il limite definito dalla variabile "successo" possa eventualmente richiedere un tempo superiore. In tal senso, uno studio clinico controllato di Ferrari

e collaboratori (Ferrari2018) ha valutato la reazione dei tessuti parodontali in seguito al posizionamento del margine di un restauro all'interno dello spazio del solco gengivale. Il restauro veniva eseguito tramite l'applicazione della tecnica definita "rilocazione del margine cervicale". Dopo un periodo di osservazione di un anno, si osservava un aumento del 53% del sanguinamento in corrispondenza dei siti sperimentali in cui il restauro diretto veniva posizionato ad una distanza radiografica dalla cresta ossea minore od uguale a 2mm.

L'assenza di BoP è uno dei parametri clinici con maggiore affidabilità nel predire futura assenza di perdita di attacco. "Per se" la zona interprossimale rappresenta una localizzazione maggiormente predisposta al sanguinamento al sondaggio (Farina2013). A fronte di una quantità di placca costante durante l'intero tempo sperimentale, i siti dei pazienti trattati con restauro raddoppiavano la frequenza del sanguinamento già dopo 3 mesi di osservazione. Questo aspetto lascia speculare circa l'effetto negativo della presenza del restauro sui tessuti parodontali marginali.

Al fine di valutare il profilo infiammatorio del sito sperimentale dal punto di vista metabolico, sono state valutate nel sito test le concentrazioni di citochine pro-infiammatorie (IL-1 α , TNF α , RANKL). Al fine di avere un controllo diretto, ciascun paziente ha fornito un proprio sito controllo (controlaterale sano). I risultati ottenuti dimostrano un'analogia per l'andamento della concentrazione di IL-1 α e TNF α . Dopo tre mesi dal posizionamento del restauro, i valori, espressi come pg/ml, risultavano aumentati; questo aumento si consolida fino ai 6 mesi post-intervento. Pochi sono i dati in letteratura che associano il profilo molecolare con la presenza di restauri diretti. Konradsson e collaboratori (Konradsson2005) hanno valutato la quantità di IL-1 α , IL-1 β e del loro recettore antagonista nel solco gengivale dopo l'esecuzione di restauri di quinta classe in composito e cemento calcio alluminato. Il protocollo prevedeva, in 15 pazienti, l'esecuzione di un restauro e la promozione di una gengivite sperimentale. I valori delle citochine venivano rilevati dopo 3 e 7 giorni. I livelli di IL-1 α , contrariamente a quanto osservato nel presente protocollo, non aumentavano durante tutto il periodo sperimentale. Tra le principali spiegazioni riguardo alla discordanza dei risultati, dobbiamo considerare la differente localizzazione del restauro, che nel caso dello studio di Konradsson, riguardava l'esecuzione di restauri di quinta classe in zona anteriore. Nel presente protocollo, invece, sono stati analizzati solamente siti interprossimali, i quali, seguendo i dati sulla storia naturale e la prevalenza dei difetti ossei parodontali, presentano una maggiore predisposizione allo sviluppo ed alla flogosi dei tessuti di supporto (Farina2013; McFall1982).

I livelli di RANKL, invece, sono rimasti costanti durante tutto il periodo sperimentale. Questa citochina regola, con la propria omeostasi, il rimodellamento della cresta ossea (Bostanci2007). Nel nostro studio il tempo di osservazione risulta ridotto per l'instaurarsi di un rimodellamento crestale. Inoltre, anche la profondità di solco media dei pazienti al baseline può aver condizionato l'espressione di questa citochina.

Un aspetto interessante del modello di regressione analizzato riguarda la significatività statistica ottenuta dalla familiarità alla malattia parodontale (valutata tramite questionario). Questo risultato indica l'influenza della suscettibilità individuale nella possibilità di avere, dopo 6 mesi dall'esecuzione di un restauro interprossimale, un sito stabile e non infiammato (variabile "risposta" del modello). I pazienti della coorte di questo studio, in assenza di familiarità, hanno una probabilità superiore di avere tessuti parodontali stabili dopo 6 mesi dal restauro. Studi sulla suscettibilità alla malattia parodontale hanno infatti evidenziato come la base genetica della malattia possa spiegare circa il 50% del fenotipo clinico e della severità del suo sviluppo (Michailowicz2001).

Il modello di regressione proposto auspicava di poter mettere in relazione la probabilità di successo dei tessuti parodontali dopo restauro e la distanza iniziale del margine del restauro dalla cresta ossea. In tal senso, una distanza radiografica tra la cresta ossea ed il margine restaurativo in composito maggiore di 2 mm sembra aumentare la probabilità di ottenere stabilità tissutale (OR= 6,5), seppur non in modo statisticamente significativo.

Il tempo di osservazione di 6 mesi, utilizzato in questo studio, può rappresentare una limitazione. Il tempo di rimodellamento dei tessuti, in seguito all'instaurarsi di un insulto flogistico, può richiedere un tempo superiore per essere identificabile sia con la diagnosi clinica che con quella radiografica (Goodson1982; Haffajee1991).

Conclusione

Nel presente studio quasi-sperimentale, il posizionamento di un margine restaurativo in prossimità o all'interno del solco gengivale sembra indurre, dal punto di vista clinico, una reazione tissutale caratterizzata dalla presenza di sanguinamento al sondaggio, approfondimento del solco gengivale, ed aumento del sondaggio transcrevicolare. Radiograficamente la distanza lineare tra il restauro e la cresta ossea sottostante aumenta rispetto al valore iniziale. Queste modificazioni tissutali vengono accompagnate da un aumento della concentrazione di alcune citochine pro-infiammatorie.

Bibliografia

- 1) Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.
- 2) Gargiulo, A. W., Wentz, F. & Orban, B. Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans. *J Periodontol.* 1961 32, 261–267.
- 3) Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S237-S248. doi: 10.1002/JPER.17-0733.
- 4) Schmidt JC, Sahrman P, Weiger R, Schmidlin PR, Walter C. Biologic width dimensions—a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2013 May;40(5):493-504. doi: 10.1111/jcpe.12078.
- 5) Vacek JS, Gher ME, Assad DA, Richardson AC, Giambarresi LI. The dimensions of the human dentogingival junction. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994;14:154–165.
- 6) Xie GY, Chen JH, Wang H, Wang YJ. Morphological measurement of biologic width in Chinese people. *J Oral Sci.* 2007;49:197–200.
- 7) Greenberg J, Laster L, Listgarten MA. Transgingival probing as a potential estimator of alveolar bone level. *J Periodontol.* 1976;47:514–517.
- 8) Ercoli C, Caton JG. Dental prostheses and tooth-related factors. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S223-S236. doi: 10.1002/JPER.16-0569.
- 9) Kinane, D. F., Peterson, M. & Stathopoulou, P. G. (2006) Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontol 2000* 40, 107–119.
- 10) Matthews DC, Tabesh M. Detection of localized tooth-related factors that predispose to periodontal infections. *Periodontol 2000.* 2004;34:136-50.
- 11) Lang NP, Kiel R, Anderhalden K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *J Clin Periodontol* 1983; 10: 563±578.
- 12) Schatzle M, Lang NP, Anerud A, Boysen H, Burgin W, Loe H. The influence of margins of restorations on the periodontal tissues over 26 years. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 57±64.

- 13) Pama-Benfenati S, Fugazzotto PA, Ferreira PM, Ruben MP, Kramer GM. The effect of restorative margins on the postsurgical development and nature of the periodontium. Part II. Anatomical considerations. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1986;6(1):64-75.
- 14) Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec;25(4):229-35.
- 15) Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol*. 1990 Nov;17(10):714-21.
- 16) Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S9-S16. doi: 10.1111/jcpe.12936.
- 17) Murakami S1, Mealey BL2, Mariotti A3, Chapple ILC4. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S17-S27. doi: 10.1002/JPER.17-0095.
- 18) Birkedal-Hansen H. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases. *J Periodontol*. 1993 May;64 Suppl 5S:474-484. doi: 10.1902/jop.1993.64.5s.474.
- 19) Offenbacher S1, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol*. 2007 Oct;78(10):1911-25
- 20) Madureira DF, Lucas De Abreu Lima I, Costa GC, Lages EMB, Martins CC et al. Tumor Necrosis Factor-alpha in Gingival Crevicular Fluid as a Diagnostic Marker for Periodontal Diseases: A Systematic Review. *J Evid Based Dent Pract*. 2018 Dec;18(4):315-331. doi: 10.1016/j.jebdp.2018.04.001. Epub 2018 Apr 28.
- 21) Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*. 2007 May;34(5):370-6. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2007.01061.x
- 22) Rasmussen L, Hänström L, Lerner UH. Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000 Jan;27(1):41-52.
- 23) Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol 2000*. 2016 Feb;70(1):53-64. doi: 10.1111/prd.12107.
- 24) Bostanci N, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontol 2000*. 2018 Feb;76(1):68-84. doi: 10.1111/prd.12154.
- 25) Dietschi D, Spreafico R. Current clinical concepts for adhesive cementation of tooth-colored posterior restorations. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1998 Jan-Feb;10(1):47-54; quiz 56.

- 26) Ferrari M, Koken S, Grandini S, Ferrari Cagidiaco E, Joda T et al. Influence of cervical margin relocation (CMR) on periodontal health: 12-month results of a controlled trial. *J Dent*. 2018 Feb;69:70-76. doi: 10.1016/j.jdent.2017.10.008.
- 27) Brill N. The gingival pocket fluid. Studies of its occurrence, composition, and effect. *Acta Odontol Scand* 1962; 20: supplement 32
- 28) Collares K, Demarco FF, Horta BL, Correa MB. Proximal restoration increases the risk of clinical attachment loss. *J Clin Periodontol*. 2018 Jul;45(7):832-840. doi: 10.1111/jcpe.12919.
- 29) Teles R, Benecha HK, Preisser JS, Moss K, Starr JR et al. Modelling changes in clinical attachment loss to classify periodontal disease progression. *J Clin Periodontol*. 2016 May;43(5):426-34. doi: 10.1111/jcpe.12539.
- 30) Teles R, Moss K, Preisser JS, Genco R, Giannobile WV et al. Patterns of periodontal disease progression based on linear mixed models of clinical attachment loss. *J Clin Periodontol*. 2018 Jan;45(1):15-25. doi: 10.1111/jcpe.12827.
- 31) Haffajee AD, Socransky SS, Lindhe J, Kent RL, Okamoto H, Yoneyama T. Clinical risk indicators for periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol*. 1991 Feb;18(2):117-25.
- 32) Farina R, Tomasi C, Trombelli L. The bleeding site: a multi-level analysis of associated factors. *J Clin Periodontol*. 2013 Aug;40(8):735-42. doi: 10.1111/jcpe.12118.
- 33) Konradsson K, van Dijken JW. Interleukin-1 levels in gingival crevicular fluid adjacent to restorations of calcium aluminate cement and resin composite. *J Clin Periodontol*. 2005 May;32(5):462-6.
- 34) McFall WT Jr. Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study. *J Periodontol*. 1982 Sep;53(9):539-49.
- 35) Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000 Nov;71(11):1699-707.
- 36) Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982 Nov;9(6):472-81.

Figure e Tabelle

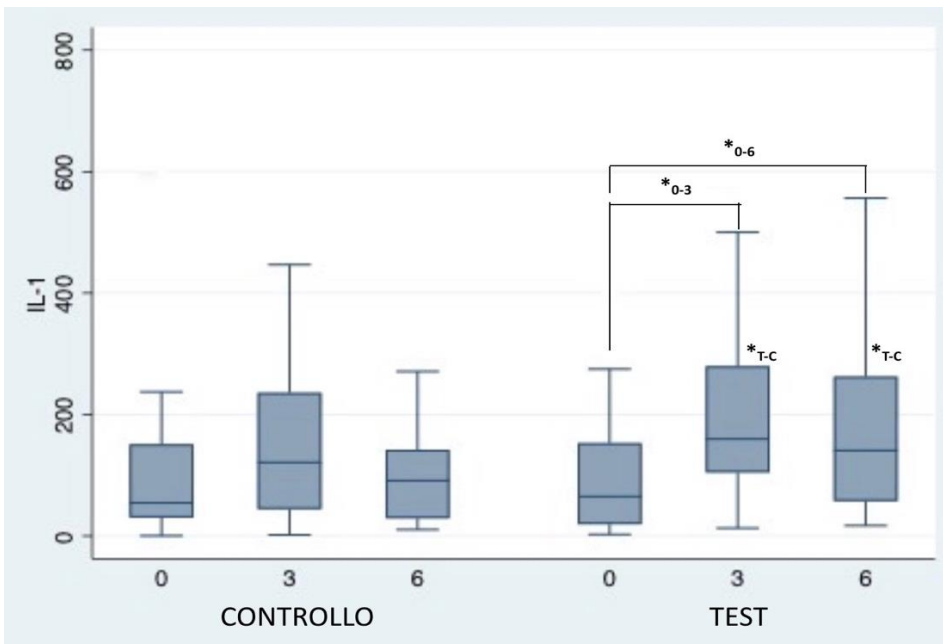


Fig. 1: confronto intragruppo ed intergruppo per le concentrazioni di IL-1 α nei siti Controllo e Test. * $p < 0.05$; *₀₋₃ $p < 0.05$ tra T₀ e T₃; *₀₋₆ $p < 0.05$ tra T₀ e T₆; *_{T-C} $p < 0.05$ tra siti Controllo e Test.

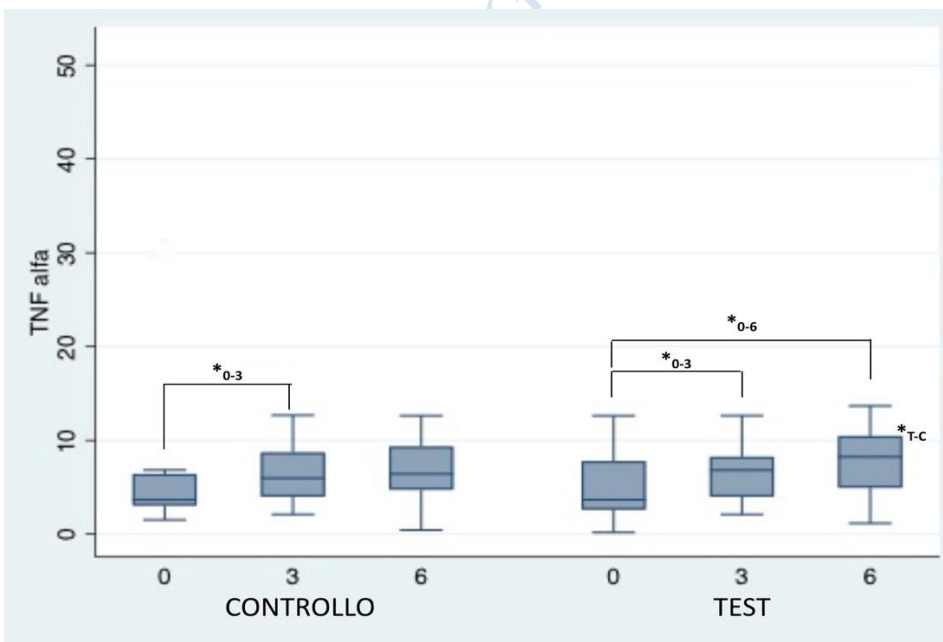


Fig. 2: confronto intragruppo ed intergruppo per le concentrazioni di TNF α nei siti Controllo e Test. * $p < 0.05$; *₀₋₃ $p < 0.05$ tra T₀ e T₃; *₀₋₆ $p < 0.05$ tra T₀ e T₆; *_{T-C} $p < 0.05$ tra siti Controllo e Test.

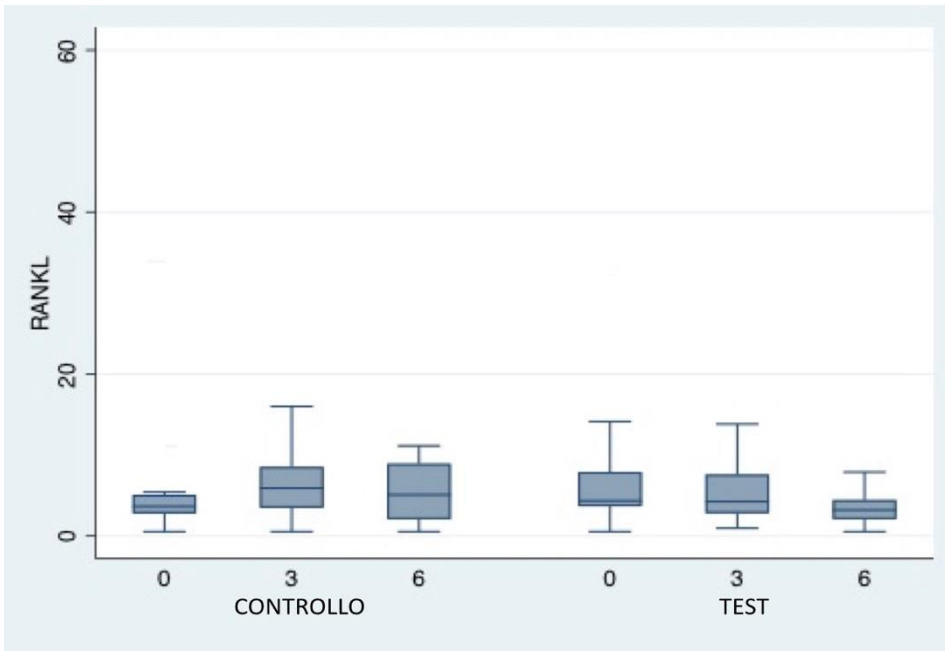


Fig. 3: confronto intragruppo ed intergruppo per le concentrazioni di RANKL nei siti Controllo e Test.
 * $p < 0.05$; * $_{0-3} p < 0.05$ tra T_0 e T_3 ; * $_{0-6} p < 0.05$ tra T_0 e T_6 ; * $_{T-C} p < 0.05$ tra siti Controllo e Test.

SIIdP-Premio H.M. Goldman 2020 Ricerca di base

Variabile	Media (Percentuale)	IC-95%
Genere, femmina	18 (48,64%)	33,44; 64,1
Familiarità, positiva	18 (48,64%)	33,44; 64,1
Età	48,37	43,16; 53,58
Fumo, sì (2)	15%	
Ex (1)	17,50%	
T ₀ PI, positiva	10 (27%)	15,4; 43,0
T ₀ BoP, positivo	12 (32,4%)	19,6; 48,5
T ₀ PPD (mm)	2,3	2,1; 2,6
T ₀ REC (mm)	,4	,1; ,7
T ₀ BS (mm)	3,6	3,3; 4,0
T ₀ R-Bc (mm)	2,0	1,7; 2,2
T ₀ FMPS	10,7	8,8; 12,5
T ₀ FMBS	13,8	12,6; 15,1
T ₃ PI, positiva	9 (25%)	13,8; 41,1
T ₃ BoP, positivo	22 (61,1%)	44,9; 75,2
T ₃ PPD (mm)	2,5	2,2; 2,7
T ₃ REC (mm)	,55	,2; ,9
T ₃ BS (mm)	4	3,7; 4,3
T ₃ R-Bc (mm)	2,22	1,9; 2,5
T ₆ PI, positiva	7 (19,4%)	9,8; 35,0
T ₆ BoP, positivo	23 (63,9%)	47,6; 77,5
T ₆ PPD (mm)	2,7	2,4; 3,0
T ₆ REC (mm)	,58	,3; ,8
T ₆ BS (mm)	4,3	3,9; 4,7
T ₆ R-Bc (mm)	2,44	2,17; 2,70

Tab. 1: statistica descrittiva della popolazione e delle variabili in studio.

	$\Delta (T_0-T_3)$	$^*p_{T_0-T_3}$	$\Delta (T_3-T_6)$	$^*p_{T_3-T_6}$	$\Delta (T_0-T_6)$	$^*p_{T_0-T_6}$
% placca+ ^{**}	2%		5,6%		7,6%	
% BoP+ ^{**}	28,7%	,0034	2,8%		31,5%	,0018
PPD ^{***}	,2		,2		,4	,0174
REC [^]	,15		,03		,18	
BS ^{***}	,4	,0121	,3	,0095	,7	,0001
R-Bc ^{***}	,22	,0020	,22	,0005	,44	,0001

Tab. 2: distribuzione delle differenze delle misurazioni ottenuti nei diversi *time points* dello studio.

* $p < 0,05$

** test di McNemar

*** test ANOVA ad una via e correzione *post-hoc* di Bonferroni

[^] test di Kruskal-Wallis

Time-Group	IL-1 α			TNF α			RANKL		
	T	C	p_{T-C}^*	T	C	p_{T-C}^*	T	C	p_{T-C}^*
0	65,03 (30,84;132,70)	52,472 (31,85;116,685)		3,68 (2,62;8,04)	4,74 (3,34;6,42)		3,66 (2,81;5,82)	3,66 (2,79;4,37)	
3	158,625 ⁺ (85,0;217,67)	122,767 (94,76;234,715)	0,0071 [*]	^{§§} 6,42 (4,74;6,84)	[§] 4,74 (3,76;8,59)		4,37 (2,81;4,77)	4,37 (3,52;9,02)	
6	131,355 ⁺⁺ (57,23;191,44)	119,27 (52,31;230,88)	0,0244 [*]	^{§§§} 6,16 (3,68;7,83)	6,16 (3,38;7,07)	0,026 [*]	2,81 (0,80;7,37)	4,13 (0,80;11,99)	

Tab. 3: livelli di IL-1 α , TNF α , RANKL nei siti Test (T) e Controllo (C) (mediana (IC-95%)).

* $p < 0,05$, confronto intergruppo per ciascun time point T_0 , T_3 , T_6 .

⁺ $p = 0,0003$, confronto intragruppo IL-1 α Test tra T_0 e T_3

⁺⁺ $p = 0,0117$, confronto intragruppo IL-1 α Test tra T_0 e T_6

[§] $p = 0,0362$, confronto intragruppo TNF α Controllo tra T_0 e T_3

^{§§} $p = 0,0373$, confronto intragruppo TNF α Test tra T_0 e T_3

^{§§§} $p = 0,0063$, confronto intragruppo TNF α Test tra T_0 e T_6

“SUCCESSO”

Variabile	Odds Ratio	Errore Standard	z	p	IC-95%
risposta					
xraybas	,1545	,210	-1,37	0,171	,011; 2,235
Fumo					
1	,072	,138	-1,37	0,170	,002; 3,074
2	,139	,231	-1,18	0,237	,005; 3,672
Familiarità	,021	,033	-2,42	0,015*	,0009; ,477
PI T ₀	3,437	4,514	0,94	0,347	,262; 45,095
Costante	3,628	4,889	0,96	0,339	,258; 50,914

Tab. 4: tabella dei risultati del modello di regressione logistica. * $p < 0,05$

SIIdP-Premio H.M. Goldman 2020 la ricerca in salute