



Società Italiana
di Parodontologia

XVI CONGRESSO NAZIONALE Parodontologia 2010

vecchi problemi, nuove soluzioni?



PREMIO
HM GOLDMAN

GLI ATTI

SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN"



Proprietà letteraria riservata: la riproduzione con qualsiasi mezzo delle pubblicazioni tutelate dal diritto d'autore è vietata e penalmente perseguibile (art. 171 della legge 22 aprile 1941, n. 633). Quest'opera è protetta ai sensi della legge sul diritto d'autore e delle Convenzioni Internazionali per la protezione del diritto d'autore (Convenzione di Berna, Convenzione di Ginevra). Nessuna parte di questa pubblicazione può essere riprodotta, memorizzata o trasmessa con qualsiasi mezzo o in qualsiasi forma (fotomeccanica, fotocopia, elettronica, ecc) senza l'autorizzazione scritta dell'Editore. In ogni caso di riproduzione abusiva si procederà d'ufficio a norma di legge.

A cura di: Società Italiana di Parodontologia (SIdP)

Segreteria di redazione: Promo Leader Service Congressi Srl, Firenze

Progetto grafico: Mauro Pispoli, Firenze

Impaginazione: Fitolito Immagine, Firenze

Finito di stampare nel mese di Marzo 2010 da Fitolito Immagine, Firenze

INDICE

Atti della Sessione di Ricerca Premio "Henry M. Goldman" 2010

Livelli crevicolari e sierici di interleuchina-1 β nella gengivite spontanea e nella gengivite sperimentale

R. Farina, C. Scapoli, A. Carrieri, G. Giovannini, G. Calura, L. Trombelli pag. 5

Un nuovo locus per la parodontite sul cromosoma 12q24.31-32 nelle popolazioni isolate del Cilento

T. Nutile, F. Polito, D. Ruggiero, R. Sorice, M. Aversano, S. Matarasso, C. Cafiero, M. Ciullo pag. 13

Trattamento di difetti infraossei con amelogenine o membrae riassorbibili e riempitivi. Studio clinico randomizzato controllato con risultati dai 7 ai 14 anni di mantenimento

S. Milani, G. Rasperini, M. Silvestri, V. Cattaneo pag. 19

Differenziazione, apoptosi ed espressione di GM-CSFR α di fibroblasti gengivali umani su differenti superfici in titanio

G. Capece, L. Postiglione, G. Di Spigna, R. Saviano, L. Ramaglia pag. 29

Analisi radiografica della perdita ossea marginale di impianti singoli nei pazienti non fumatori parodontalmente compromessi trattati e nei pazienti non fumatori parodontalmente sani. Studio retrospettivo controllato a 10 anni

V. Iorio Siciliano, G. Rasperini, C. Cafiero, M. Aglietta, A. Blasi, S. Matarasso, G.E. Salvi, N.P. Lang pag. 39

Deposizione di matrice ossea umana in vitro da cellule isolate dalla membrana di Schneider

A. Graziano, L. Benedetti, G. Massei, M. Aimetti pag. 47

PREMIO
HM GOLDMAN





LIVELLI CREVICOLARI E SIERICI DI INTERLEUCHINA-1 β NELLA GENGIVITE SPONTANEA E NELLA GENGIVITE SPERIMENTALE

R. Farina¹, C. Scapoli^{2,1}, A. Carrieri², G. Giovannini³, G. Calura¹, L. Trombelli¹

1 Centro di Ricerca e Servizi per lo Studio delle Malattie Parodontali, Università di Ferrara

2 Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università di Ferrara

3 Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Arcispedale S. Anna, Ferrara

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2010

RIASSUNTO

Il presente studio è stato condotto per valutare (i) i livelli di interleuchina 1 β (IL-1 β) nel fluido crevicolare gengivale (GCF) e nel siero durante la gengivite placca-associata spontanea (S) e indotta sperimentalmente (I) e (ii) l'influenza di alcuni polimorfismi genici sull'espressione fenotipica di IL-1 β . I risultati indicano che aspetti relativi all'insulto microbico ai tessuti gengivali quali l'entità e il rate di accumulo della placca sembrano influenzare i livelli di IL-1 β nel GCF nei soggetti con uno specifico genotipo di IL-1B.

INTRODUZIONE

Durante gli ultimi anni, abbiamo sviluppato e validato un modello di gengivite sperimentale nell'uomo (Trombelli et al. 2004, Trombelli et al. 2008) e lo abbiamo utilizzato per identificare alcuni fattori che influenzano la suscettibilità individuale all'infiammazione gengivale placca-associata. Le differenze significative nella risposta infiammatoria gengivale ad accumuli di placca sostanzialmente identici dal punto di vista quantitativo e qualitativo che sono state riportate (Trombelli et al. 2004) suggeriscono che la risposta gengivale all'insulto microbico possa essere una caratteristica individuale (Tatakis & Trombelli 2004), dipendente da fattori legati all'ospite, possibilmente genetici in origine (Tatakis & Trombelli 2004, Scapoli et al. 2005, 2007).

La risposta infiammatoria gengivale al biofilm batterico è in parte mediata e regolata da citochine pro-infiammatorie, tra le quali l'interleuchina-1 β (IL-1 β) svolge un ruolo determinante (Barksby et al. 2007). Quando i livelli di IL-1 β sono stati valutati in condizioni di infiammazione gengivale placca-associata spontanea, i pazienti con gengivite hanno mostrato quantità più elevate di IL-1 β nel fluido crevicolare gengivale (GCF) quando comparati a individui parodontalmente sani senza segni clinici di infiammazione gengivale. Inoltre, Fitzsimmons et al. (2009) hanno riportato una correlazione significativa tra il livello di IL-1 β nel GCF e gli indici clinici utilizzati per quantificare l'infiammazione gengivale. In modo consistente, la concentrazione di IL-1 β nel

GCF è stata anche associata con la severità clinica dell'infiammazione gengivale nella gengivite sperimentale. Dopo 3 giorni di astensione dall'igiene orale, è stata osservata una aumentata concentrazione di IL-1 β nel GCF che ha anticipato la manifestazione clinica dell'infiammazione gengivale (Zhang et al. 2002). L'astensione dal controllo di placca meccanico per intervalli di tempo più lunghi (18-28 giorni) induce un aumento nei livelli di IL-1 β nel GCF associati con una risposta infiammatoria gengivale clinicamente evidente. Complessivamente, queste osservazioni mostrano che la concentrazione di IL-1 β nel GCF può essere considerata come un marker attendibile associato con la presenza e la severità dell'infiammazione gengivale placca-associata. Tuttavia, è stata riportata una elevata variabilità inter-individuale della concentrazione di IL-1 β nel GCF di pazienti con infiammazione gengivale, suggerendo che la produzione di IL-1 β indotta dall'insulto microbico possa essere sotto regolazione genetica.

In un precedente studio, abbiamo valutato l'associazione tra la variabilità del gene che codifica per IL-1 β (IL-1B) e i parametri clinici della gengivite. Quando due sottogruppi di soggetti, caratterizzati da una diversa risposta infiammatoria gengivale a parità di entità e rate di accumulo di placca, sono stati confrontati per la frequenza di alcuni polimorfismi genici di IL-1B, una differenza inter-gruppo statisticamente significativa nella distribuzione dei genotipi è stata osservata per il polimorfismo IL-1B⁻⁵¹¹ (Scapoli et al. 2005). Ad oggi, tuttavia, l'evidenza scientifica è ancora insufficiente per definire la relazione tra il genotipo di IL-1B, i livelli di IL-1 β nel GCF e la suscettibilità del paziente all'infiammazione gengivale (Greenstein & Hart 2002).

Recentemente, abbiamo avanzato l'ipotesi che il nostro modello sperimentale possa essere utilizzato per identificare a priori (ovvero in condizioni di gengivite spontanea) soggetti che possono sviluppare una risposta infiammatoria gengivale bassa o spiccata in condizioni sperimentali (ovvero dopo il completamento di un trial di 21 giorni di gengivite sperimentale). Sulla base di questa ipotesi, abbiamo recentemente osservato che soggetti che, dopo due trial di gengivite sperimentale, mostrano una severità della infiammazione gengivale placca-associata consistentemente bassa o elevata, mostrano anche una infiammazione gengivale consistentemente bassa o elevata quando osservati nel loro "stato naturale" di gengivite spontanea (Trombelli et al. 2008). Pertanto, nel presente studio, abbiamo adottato il nostro modello per valutare i livelli di IL-1 β nel GCF e nel siero in condizioni di gengivite sia spontanea che sperimentale. Inoltre, è stata anche indagata l'influenza di alcuni polimorfismi genici di IL-1B sull'espressione fenotipica di IL-1 β nel GCF e nel siero.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale e popolazione di studio

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico della Provincia di Ferrara e tutti i partecipanti hanno fornito il consenso informato scritto prima dell'inizio dello studio. Dopo un primo trial clinico split mouth, randomizzato controllato di gengivite sperimentale (1° trial), condotto da Ottobre 2000 a Novembre 2001, due sottopopolazioni di individui parodontalmente sani sono state identificate e rispettivamente definite come high responders (HR, n=24) e low responders (LR, n=24) sulla base di una risposta infiammatoria gengivale significativamente differente ad accumuli di placca sovrapponibili (Trombelli et al. 2004). In Gennaio 2002, abbiamo richiamato

i soggetti HR e LR per verificare la loro disponibilità ed elegibilità per la partecipazione ad un secondo trial (repeat trial) (Trombelli et al. 2008). I volontari sono stati sottoposti al repeat trial tra Aprile e Novembre 2002. I dettagli dei protocolli sperimentali sono descritti in dettaglio altrove (Trombelli et al. 2004, Trombelli et al. 2008). Abbiamo così potuto discriminare due sottopopolazioni di soggetti con una risposta infiammatoria (valutata clinicamente) consistentemente alta (HR/HS, n=10) o bassa (LR/LS, n=10) ad accumuli di placca sovrapponibili dopo la loro partecipazione al 1° trial e al repeat trial (Trombelli et al. 2008).

In ciascun soggetto, un quadrante mascellare è stato identificato come “test” e il quadrante controlaterale come “controllo” in accordo ad una lista di randomizzazione. Due settimane prima del repeat trial, i soggetti sono stati sottoposti ad una prima valutazione, che ha compreso la registrazione dei parametri clinici e immunologici descritti nei paragrafi successivi. L'accumulo di placca, l'infiammazione gengivale e gli aspetti quantitativi/qualitativi del GCF sono stati valutati nei quadranti test e controllo quando il soggetto era in condizioni naïve (naturali). Queste condizioni sono state considerate come gengivite spontanea (S). Al momento della prima valutazione, i soggetti hanno anche ricevuto uno scaling sopra e sotto-gengivale e istruzioni di igiene orale per ripristinare uno stato di salute gengivale (ovvero GI=0 in tutti i denti/siti sperimentali) in condizioni di ottimo controllo di placca. Dopo 14 giorni, i volontari sono stati sottoposti ad un trial di 21 giorni di gengivite sperimentale. Nei quadranti test, la gengivite è stata sperimentalmente indotta mediante l'astensione dalle manovre di igiene orale, mentre nei quadranti controllo l'igiene orale è stata consentita per assicurare un adeguato controllo di placca (Trombelli et al. 2004, 2008). Dopo 21 giorni di gengivite sperimentale, tutti i soggetti sono stati rivalutati per i parametri clinici e immunologici. Queste condizioni sono state considerate come gengivite sperimentalmente indotta (I). Pertanto, ciascun soggetto è stato valutato in due differenti condizioni di accumulo di placca e relativa infiammazione gengivale nei quadranti test e controllo: la gengivite S e la gengivite I.

Parametri clinici

Alla prima valutazione e dopo 21 giorni di gengivite sperimentale, i seguenti parametri sono stati valutati nei siti vestibolari e mesio-vestibolari degli incisivi laterali, dei primi premolari e dei primi molari mascellari, nell'ordine seguente: Indice Gengivale (GI), Indice di Placca (PII), e Indice di Sanguinamento Angolato (AngBS). Tutti i parametri sono stati registrati da 2 esaminatori calibrati con un buono-eccellente accordo intra- e inter-esaminatore (Trombelli et al. 2004, 2008).

IL-1 β nel siero e nel GCF

Alla prima valutazione e dopo 21 giorni di gengivite sperimentale, 20 ml di sangue venoso sono stati ottenuti da ciascun paziente. Il siero è stato isolato per centrifugazione e stoccato a -80°C. La concentrazione di IL-1 β nel siero (sIL-1 β) è stata quantificata con un sistema ad elevata sensibilità (s-Es; Quantikine HS, R&D System, Minneapolis, MI, USA) utilizzando set OptEIA commercialmente disponibili per IL-1 β umana (PharMingen, San Diego, CA, USA), in accordo alle istruzioni del fabbricante.

Alla prima valutazione e dopo 21 giorni di gengivite sperimentale, per ottenere la concentrazione

di IL-1 β nel GCF (cIL-1 β) è stato effettuato il campionamento del GCF dai siti vestibolari e mesio-vestibolari degli incisivi laterali, dei primi premolari e dei primi molari mascellari nei quadranti test e controllo. Il GCF è stato raccolto dopo le valutazioni di GI e PII. Dopo l'isolamento dell'area (rullo di cotone o garza) e la rimozione della placca sopragengivale con una curette o uno scaler, il GCF è stato raccolto su strisce di carta assorbente (Perio-paper®; IDE Interstate, Amityville, NY, USA), come descritto precedentemente (Fransson et al. 1999). Le strisce sono state posizionate in tubi contenenti un medium (1 ml di PBS e albumina sierica bovina) e stoccate a -70°C fino all'estrazione del GCF. Per eseguire l'estrazione del GCF, i tubi sono stati sonicati per 5 minuti e centrifugati a 3500 giri/min a 4°C per 15 minuti. I surnatanti estratti sono stati aliquotati in 5 eppendorf (ciascuna contenente 200 μ l) e stoccati a -80°C fino all'analisi.

I campioni di GCF e di siero sono stati analizzati per IL-1 β con ELISA (ELISA hIL-1 β ; Bio Source International, Camarillo, US). Le analisi sono state eseguite in accordo alle istruzioni del fabbricante. Tutte le valutazioni ELISA sono state eseguite in duplicato. I risultati sono stati calcolati utilizzando le curve standard create in ciascun saggio. Le concentrazioni della citochina nel GCF sono state corrette per il volume di GCF ed espresse in pg/ml.

Analisi dei polimorfismi di IL-1B

I metodi per l'analisi dei polimorfismi di IL-1B dal sangue periferico sono stati riportati precedentemente (Scapoli et al. 2005). Nel presente studio, sono stati considerati i seguenti polimorfismi di IL-1B con reazione della polimerasi a catena (PCR):

- IL-1B⁺³⁹⁵⁴. La PCR ha interessato la regione 194 bp di IL-1B. I genotipi del polimorfismo del frammento di restrizione (RFLP) IL-1B⁺³⁹⁵⁴ (allele 1: C; allele 2: T) sono stati determinati con Taq1 (GeneRuler DNA Ladder Plus; Promega, Milano, Italia). Due frammenti di 86 and 108 bp sono stati osservati in soggetti omozigoti per l'allele 1 e un singolo frammento di 194 bp in soggetti omozigoti per l'allele 2;

- IL-1B⁻⁵¹¹. La regione 304 bp sul promoter di IL-1B è stata amplificata e i genotipi del RFLP IL-1B⁻⁵¹¹ (allele 1: C; allele 2: T) sono stati determinati con Aval (Amersham Biosciences, Cologno Monzese, Italia). Due frammenti di 194 e 114 bp sono stati osservati in soggetti omozigoti per l'allele 1 e un singolo frammento di 304 bp in soggetti omozigoti per l'allele 2.

ANALISI STATISTICA

Il soggetto è stato considerato come unità statistica. Per ciascun parametro, i valori registrati dai 6 siti selezionati (3 denti; 2 siti per ciascun dente) per ciascun quadrante sono stati mediati per ottenere un valore medio rappresentativo del soggetto per il quadrante test e per il quadrante controllo. Pertanto, per ciascun parametro a ciascun tempo di osservazione, il soggetto è stato rappresentato da un singolo valore per il quadrante test e da un singolo valore per il quadrante controllo.

Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato effettuato per ciascuna variabile per determinarne il tipo di distribuzione. I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD) per le variabili parametriche (PII, GI) o mediana e intervallo inter-quartile (IR) per le variabili non parametriche (AngBS, cIL-1 β , sIL-1 β). I confronti sono stati eseguiti con il test t di Student per dati appaiati e il

test di Wilcoxon per le variabili parametriche e non-parametriche, rispettivamente. Per verificare l'effetto dei differenti gruppi o del genotipo sui parametri immunologici è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis. Quando necessario, sono stati effettuati confronti post-hoc multipli per un test di significatività a due code. I test di correlazione di Pearson e Spearman sono stati effettuati per valutare la forza dell'associazione tra le variabili parametriche e non-parametriche, rispettivamente. Il livello di significatività è stato fissato al 5%.

RISULTATI

Popolazione di studio

37 soggetti (20 maschi e 17 femmine; età media: 23.7 ± 1.8 anni) sono stati sottoposti alla prima valutazione e hanno completato il trial di gengivite sperimentale. In un soggetto, l'analisi di IL-1 β nel GCF non è stata possibile per motivi tecnici. Pertanto, l'analisi statistica è stata condotta su 36 soggetti.

Accumulo di placca e infiammazione gengivale nella gengivite S e nella gengivite I

I valori di PII, GI e AngBS nella gengivite S e I nei quadranti test e controllo sono riportati nella Tabella 1. Nei quadranti test, un accumulo di placca (PII, $p < 0.0001$) e una infiammazione gengivale più rappresentati (GI e AngBS, $p < 0.0001$) sono stati osservati nella gengivite I rispetto alla gengivite S. In contrasto, PII e GI significativamente più bassi sono stati osservati nella gengivite I rispetto alla gengivite S nei quadranti controllo (PII, $p < 0.01$; GI, $p < 0.001$). Nella gengivite S, nessuna differenza significativa in PII, GI e AngBS è stata osservata tra i quadranti test e controllo. Nella gengivite I, PII, GI e AngBS erano significativamente più elevati nei quadranti test rispetto ai quadranti controllo ($p < 0.0001$).

cIL-1 β e sIL-1 β nella gengivite S e nella gengivite I

I valori di sIL-1 β e cIL-1 β nei quadranti test e controllo in condizioni di gengivite S e I sono riportati in Tabella 1. Valori di cIL-1 β significativamente più alti sono stati osservati nella gengivite I rispetto alla gengivite S sia nei quadranti test ($p < 0.0001$) che nei quadranti controllo ($p < 0.001$). Nella gengivite I, cIL-1 β era significativamente più alta nei quadranti test rispetto ai quadranti controllo ($p < 0.0001$). Una correlazione positiva statisticamente significativa è stata individuata tra cIL-1 β nella gengivite S e cIL-1 β nella gengivite I nei quadranti controllo (Spearman = 0.34, $t_{N-2} = 2.12$, $p < 0.05$), ma non nei quadranti test (Figura 1).

sIL-1 β era a livelli superiori alla soglia di rilevazione in 6 soggetti nella gengivite S e in 7 soggetti nella gengivite I, ed è rimasta invariata nel corso dello studio ($p > 0.05$).

Livelli di IL-1 β nei soggetti HR/HS e LR/LS

Quando le due sottopopolazioni di soggetti HR/HS e LR/LS (Trombelli et al. 2008) sono state confrontate per cIL-1 β e sIL-1 β , nessuna differenza significativa è stata osservata nei quadranti test e controllo nella gengivite S e nella gengivite I.

Associazione tra i polimorfismi di IL-1B e la concentrazione di IL-1β

Nessuna associazione significativa è stata osservata tra il genotipo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e le concentrazioni di IL-1β nella gengivite S. Nella gengivite I, il genotipo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ era significativamente associato con cIL-1β nei quadranti test ($p < 0.01$), ma non con cIL-1β nei quadranti controllo. I valori di cIL-1β nei quadranti test nella gengivite I nella popolazione di studio categorizzata per i differenti genotipi di IL-1B⁺³⁹⁵⁴ sono illustrati nella Tabella 2. Il genotipo TT ha mostrato valori di cIL-1β significativamente più elevati in confronto al genotipo CC ($p = 0.007$) e una differenza statisticamente borderline in confronto agli eterozigoti ($p = 0.06$).

Nessuna associazione significativa è stata trovata tra il genotipo IL-1B⁻⁵¹¹ e cIL-1β sia nella gengivite S che nella gengivite I. Nessuna associazione significativa è stata individuata tra i livelli di sIL-1β e i genotipi IL-1B⁻⁵¹¹ o IL-1B⁺³⁹⁵⁴.

CONCLUSIONI

I risultati del presente studio indicano che: (i) i livelli di cIL-1β erano significativamente più elevati nella gengivite I rispetto alla gengivite S; (ii) è stata osservata una correlazione intra-individuale tra i livelli di cIL1β nella gengivite S e nella gengivite I nei quadranti controllo, ma non nei quadranti test; (iii) è stata osservata una associazione tra cIL-1β e il genotipo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ solo nei quadranti test; (iv) sIL-1β era identificabile solo a livelli molto bassi in un numero limitato di soggetti, senza differenze significative tra gengivite S e I. Nel loro complesso, tali risultati indicano che aspetti relativi all'insulto microbico ai tessuti gengivali quali l'entità e il rate di accumulo della placca sembrano influenzare i livelli di IL-1β nel GCF nei soggetti con uno specifico genotipo di IL-1B.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato supportato dal Centro di Ricerca e Servizi per lo Studio delle Malattie Parodontali, Università di Ferrara, e da GABA International, Munchenstein, Switzerland. Gli Autori desiderano esprimere la propria gratitudine alle Dr.sse Marina Tosi, Elisa Orlandini e Sabrina Bottega, Università di Ferrara, per il loro servizio clinico. Gli Autori non hanno conflitti di interesse da dichiarare.

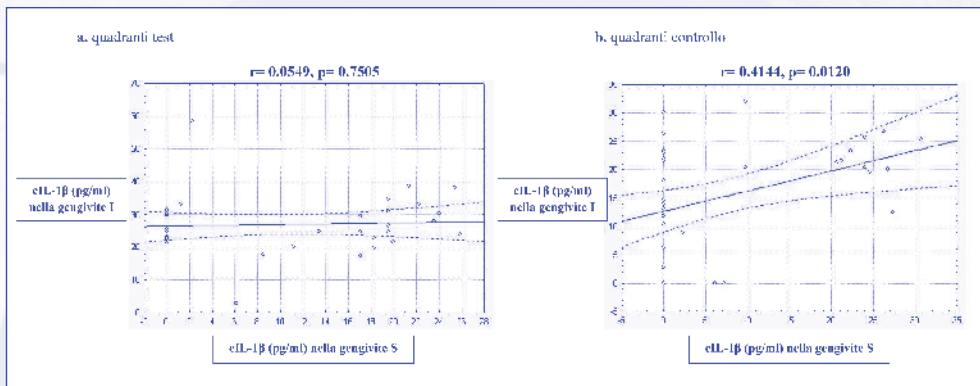


Fig. 1 - Distribuzione dei soggetti (punti) in accordo alla concentrazione (pg/ml) di interleuchina 1β nel fluido crevicolare gengivale (cIL-1β) in condizioni di gengivite spontanea (S) e di gengivite sperimentale (I) nei quadranti a. test e b. controllo. Linea continua: correlazione lineare; linea tratteggiata: intervallo di confidenza 95%.

Tabella 1 - Indice di Placca (PII), Indice Gengivale (GI) e Indice di Sanguinamento Angolato (AngBS), concentrazione di interleuchina-1β nel fluido crevicolare gengivale (cIL-1β) nei quadranti test e controllo e concentrazioni di interleuchina 1β nel siero (sIL-1β) nella gengivite spontanea (S) e nella gengivite sperimentale (I). I valori sono espressi come media ± deviazione standard (SD) o mediana e intervallo inter-quartile (IR) per le variabili parametriche e non-parametriche, rispettivamente.

Parametro sperimentale	Gengivite	Quadrante controllo		Quadrante test		p
		N	Media ± SD o mediana (IR)	N	Media ± SD o mediana (IR)	
PII	Gengivite S	36	0.6 ± 0.3	36	0.6 ± 0.3	p= 0.191
	Gengivite I	36	0.5 ± 0.3 p< 0.01	36	1.8 ± 0.4 p< 0.0001	p< 0.0001
GI	Gengivite S	36	0.4 ± 0.3	36	0.4 ± 0.2	p= 0.618
	Gengivite I	36	0.2 ± 0.2 p< 0.001	36	0.9 ± 0.2 p< 0.0001	p< 0.0001
AngBS	Gengivite S	36	0 (0 - 0.2)	36	0 (0 - 0)	p= 0.091
	Gengivite I	36	0 (0 - 0) non significativo	36	0.3 (0.2 - 0.5) p< 0.0001	p< 0.0001
cIL-1b (pg/ml)	Gengivite S	36	0 (0 - 20.9)	36	9.8 (0 - 19.5)	p= 0.264
	Gengivite I	36	18.1 (7.6 - 22.5) p< 0.001	36	25.2 (22.5 - 31.1) p< 0.0001	p< 0.0001
Parametro sperimentale sIL-1b (pg/ml)	Tempo di osservazione	N	Media ± SD o mediana (IR)			
	Gengivite S	36	0 (0 - 0)			
	Gengivite I	36	0 (0 - 0)			
p				p= 0.938		

Tabella 2 - Concentrazione di interleuchina-1 β nel fluido crevicolare gengivale (cIL-1 β) nei quadranti test in condizioni di gengivite sperimentale nella popolazione di studio categorizzata per i differenti genotipi di IL-1B⁺³⁹⁵⁴. I valori sono espressi come pg/ml.

Genotipo di IL-1B ⁺³⁹⁵⁴	N	Mediana	Intervallo inter-quartile
CT	17	26.7	23.2 - 31.0
TT*	4	35.6	32.2 - 48.3
CC	15	23.0	21.2 - 29.0
All	36	25.2	22.5 - 31.1

* Gli omozigoti TT hanno mostrato concentrazioni di IL-1 β significativamente più elevate rispetto agli omozigoti CC (P=0.007) L una differenza statisticamente borderline quando confrontati con gli eterozigati (P=0.06).

BIBLIOGRAFIA

- Barksby H.E., Lea S.R., Preshaw P.M., & Taylor J.J. (2007) The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and Experimental Immunology* 149, 217-225.
- Fitzsimmons T., Sanders A., Slade G. & Bartold P. (2009) Biomarkers of periodontal inflammation in the Australian adult population. *Australian Dental Journal* 54, 115-122.
- Fransson C., Mooney J., Kinane D.F. & Berglundh T. (1999) Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* 26, 453-460.
- Greenstein G. & Hart T.C. (2002) A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* 73, 231-247.
- Scapoli C., Tatakis D.N., Mamolini E. & Trombelli L. (2005) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: interleukin-1 gene cluster polymorphisms. *Journal of Periodontology* 76, 49-56.
- Scapoli C., Mamolini E. & Trombelli L. (2007) Role of IL-6, TNF-A and LT-A variants in the modulation of the clinical expression of plaque-induced gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* 34, 1031-1038.
- Tatakis D.N. & Trombelli L. (2004) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *Journal of Clinical Periodontology* 31, 229-238.
- Trombelli L., Tatakis D.N., Scapoli C., Bottega S., Orlandini E. & Tosi M. (2004) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of “high-responder” and “low-responder” subjects. *Journal of Clinical Periodontology* 31, 239-252.
- Trombelli L., Farina R., Minenna L., Carrieri A., Scapoli C. & Tatakis D.N. (2008) Experimental gingivitis: reproducibility of plaque accumulation and gingival inflammation parameters in selected populations during a repeat trial. *Journal of Clinical Periodontology* 35, 955-960.
- Zhang J., Kashket S. & Lingström P. (2002) Evidence for the early onset of gingival inflammation following short-term plaque accumulation. *Journal of Clinical Periodontology* 29, 1082-1085. Erratum in: *Journal of Clinical Periodontology* (2003) 30, 278.



UN NUOVO LOCUS PER LA PARODONTITE SUL CROMOSOMA 12q24.31-32 NELLE POPOLAZIONI ISOLATE DEL CILENTO

T. Nutile¹, F. Polito², D. Ruggiero¹, R. Sorice¹, M. Aversano¹, S. Matarasso²,
C. Cafiero², M. Ciullo¹

¹Istituto di Genetica e Biofisica A. Buzzati-Traverso, CNR, Napoli;

²Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali- Università degli Studi di Napoli 'Federico II', Napoli.

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2010

RIASSUNTO

La insorgenza della parodontite è strettamente legata a fattori genetici e ambientali. Lo studio condotto sulle popolazioni isolate del Cilento ha permesso di identificare un nuovo locus, sul cromosoma 12q, associato a tale patologia. In tale regione sono presenti dei geni, candidati ad essere coinvolti nella sua patogenesi.

INTRODUZIONE

La parodontite è una patologia infiammatoria causata dall'accumulo di placca muco-batterica nel solco gengivale che porta alla perdita progressiva dei tessuti parodontali. Studi epidemiologici, svolti con criteri selettivi molto rigorosi, mostrano che, in generale, la prevalenza della parodontite aumenta con l'età. La parodontite è un esempio paradigmatico di malattia infiammatoria multifattoriale ad eziologia batterica la cui insorgenza è data dall'interazione fra fattori genetici di suscettibilità e fattori di rischio ambientali. La presenza dei fattori di rischio aumenta la probabilità che la malattia si manifesti. Il decorso della parodontite può essere aggravato dalla presenza del polimorfismo genico dell'IL-1. I soggetti, pari a circa il 30% della popolazione, che presentano il genotipo IL1+ presentano una maggiore suscettibilità alla malattia. In letteratura esiste un unico caso di grave parodontite per la quale è stata identificata la presenza di un gene principale di malattia che segue i principi di Mendel [1]. Si suppone pertanto che la parodontite sia una patologia in cui varianti genetiche e fattori ambientali rivestono, nella sua insorgenza, un'importanza determinante [2-3]. Una notevole difficoltà nell'identificare i fattori genetici di suscettibilità delle malattie multifattoriali si riscontra nelle popolazioni aperte poiché è presente una grande variabilità genetica e degli stili di vita. Le popolazioni isolate, al contrario, condividono un comune stile di vita, presentano una ridotta variabilità genetica in quanto derivano da un esiguo numero di fondatori ed hanno una storia demografica caratterizzata da secoli di iso-

lamento geografico o culturale che ha favorito, nel corso delle generazioni, le unioni tra individui della comunità senza quindi alcun contributo genetico proveniente dall'esterno [4]. Inoltre per esse è possibile costruire la genealogia e recuperare informazioni anamnestiche e personali. Le popolazioni isolate sono state già utilizzate come sistema modello per la ricerca di geni correlati alle patologie complesse. In particolare nelle popolazioni isolate del Cilento (provincia di Salerno), caratterizzate per la parodontite nel presente studio, sono stati già individuati locus correlati a malattie multifattoriali quali l'ipertensione e l'obesità (Ciullo M. et al., 2006; Ciullo M. et al., 2008).

MATERIALI E METODI

Allo scopo di identificare nuovi fattori di rischio genetici per la parodontite, sono stati raccolti i dati clinici di 738 individui in due popolazioni isolate dell'entroterra cilentano (Gioi e Cardile) [5]. Sono state raccolte le informazioni anagrafiche di ciascun partecipante (sesso, età, anamnesi patologica, fumo, alcool, abitudini di igiene orale, ecc.). Successivamente è stato effettuato l'esame obiettivo del cavo orale, rilevato il DMFT ed eventuali alterazioni patologiche delle mucose. Si è passato infine alla valutazione dello stato di salute dei tessuti parodontali. Tale analisi è stata effettuata tramite il Periodontal Screening and Recording (P.S.R., American Academy of Periodontology, 1993). In sintesi, dopo aver diviso la bocca in sei sestanti è stato registrato il valore più elevato della profondità di sondaggio in ciascun sestante. Sono stati considerati affetti da parodontite gli individui che presentavano almeno 3 tasche parodontali profonde. Gli individui affetti risultavano collegati in un'unica genealogia. Tale genealogia è stata suddivisa in famiglie e le famiglie ottenute sono state analizzate mediante un'analisi di linkage, utilizzando il programma ALLEGRO [6], con 1.018 marcatori microsatelliti distribuiti su tutto il genoma ad una distanza media di 3,6 cM. Il tipo di linkage usato è stato quello non parametrico. Esso, a differenza di quello parametrico, non richiede nessuna assunzione sulle caratteristiche dell'allele a rischio e sulla modalità di trasmissione, risulta quindi adatto allo studio di malattie complesse in cui non è noto il modello genetico associato alla malattia. Il linkage non parametrico si basa sulla ricerca di un eccesso di regioni identiche per discendenza (IBD) tra individui affetti da una data patologia. Gli individui affetti presenti in nuclei familiari vengono confrontati a coppie e per ogni coppia vengono stimate le regioni IBD sulla base dei marcatori genetici disponibili sul genoma. Tale stima viene confrontata con la proporzione di regioni IBD attesa sulla base della relazione di parentela presente nella coppia di individui. In caso di linkage ad un dato locus, si osserverà, in quel punto, una distorsione della proporzione di alleli IBD rispetto a quella attesa. Quindi, un eccesso di IBD tra gli individui affetti da una data patologia in una determinata regione del genoma, suggerisce che in tale regione vi siano uno o più geni che possano essere associati alla patologia. Dall'analisi statistica viene prodotto uno score "Zlr" per ogni marcatore. Uno score elevato è indicativo di un segnale di linkage in quel punto del genoma. La significatività dello score viene poi valutata mediante simulazioni. Gli algoritmi utilizzati per la stima delle regioni IBD nell'analisi di linkage possono essere applicati solo a famiglie di dimensioni relativamente ridotte. Di conseguenza, genealogie di grandi dimensioni come quelle presenti nelle popolazioni isolate devono essere tagliate in modo da ottenere dei sub-pedigrees di dimensioni

più piccole. Esistono programmi che consentono di tagliare la genealogia in modo automatico come il programma Jenti proposto da Falchi e collaboratori [7]. Tale metodo permette, mediante la definizione a priori di determinati parametri (ad esempio la relazione di parentela tra gli individui, il numero di generazioni), di generare famiglie tali che esse siano quanto più possibile informative per l'analisi di linkage (es: massimizzazione del numero di individui affetti all'interno delle famiglie) ed abbiano dimensioni tali da poter essere analizzate dai programmi di linkage. La significatività dei risultati dell'analisi di linkage è stata verificata mediante simulazioni. In particolare, sono stati simulati, mediante l'uso del programma Genedrop [8], i dati genotipici dell'intera genealogia. Le famiglie utilizzate nell'analisi dei dati sono state quindi sottoposte all'analisi di linkage utilizzando i genotipi simulati ed il fenotipo reale. Tale procedura simulazione dei genotipi/linkage è stata ripetuta un numero n di volte in modo tale da ottenere una distribuzione di Zlr scores per ogni marcatore. Il "p-value" è stato calcolato applicando il criterio di Bonferroni: il valore corrispondente al numero di volte in cui lo score ottenuto dalle simulazioni è superiore al massimo valore di Zlr-score ottenuto nell'analisi dei dati reali è stato diviso per il numero delle simulazioni effettuate.

RISULTATI

La Parodontite è stata analizzata nella popolazione di Gioi-Cardile. La popolazione analizzata ha un'età media di 46,8 anni di cui il 58% è di sesso femminile. Tra i soggetti analizzati, 77 sono stati definiti affetti da parodontite. L'età media degli individui affetti è superiore all'età media degli individui appartenenti al campione di studio, il 69,3% ha un'età compresa tra i 41 e gli 80 anni, il 14% della popolazione maschile è affetta mentre lo è solo il 9% della popolazione femminile (Tabella 1).

Gli individui affetti sono presenti in un unico pedigree di 15 generazioni e 2.709 individui. Il taglio del pedigree ha generato 18 famiglie sulle quali è stata effettuata l'analisi di linkage genome-wide non parametrica che ha evidenziato un segnale sul cromosoma 12q24.31-32 (Figura 1). Il valore massimo di Zlr-Score è stato ottenuto al marcatore D12S1614 (Tabella 2). Per verificare la significatività del risultato ottenuto sono state effettuate 10.000 simulazioni. Poiché le simulazioni richiedono lunghi tempi di analisi, esse sono state eseguite unicamente sul cromosoma 12 ed hanno prodotto un Zlr_p-value "cromosomico" di 0,0027 (ovvero in solo 27/10.000 simulazioni il valore di Zlr sul cromosoma 12 era maggiore del valore di Zlr trovato sui dati reali, $Zlr=3,65$). Dal p-value "cromosomico" è stato ottenuto un p-value "genomico" statisticamente significativo di 0,042, semplicemente rapportando la lunghezza del cromosoma rispetto a quella del genoma.

DISCUSSIONE

La scelta delle popolazioni isolate per lo studio della parodontite è giustificata dal fatto che nelle popolazioni derivate da un piccolo numero di fondatori il network di geni che contribuisce alla definizione della patologia complessa è ridotto. Inoltre, si ritiene che tutti gli individui affetti della popolazione abbiano una predisposizione genetica ad una data patologia perché condividono gli stessi alleli che sono identici in quanto discendenti da un antenato comune. Da qui nasce lo stu-

dio effettuato sulle popolazioni isolate del Cilento allo scopo di individuare le variazioni genetiche che predispongono alla parodontite. La parodontite costituisce una patologia multifattoriale, e dal momento che indagini epidemiologiche sostengono la sua ereditarietà, diversi studi di letteratura si sono concentrati sui geni dei mediatori immunitari, le citochine.

Il presente lavoro è il primo studio sulla parodontite in cui si analizza l'intero genoma mediante linkage genetico.

L'analisi di linkage ha evidenziato un segnale significativo sul cromosoma 12 nella regione 12q24.31-12q24.32. In tale regione del cromosoma 12 è localizzata, a 3,2 Mb dal segnale di linkage trovato, il gene che codifica per l'Interleuchina-31.

L'IL-31 ha una struttura simile alle proteine appartenenti alla famiglia della citochina IL-6 che è stata precedentemente associata alla parodontite [9]. Tale gene quindi è un buon candidato ad essere coinvolto nella patogenesi della patologia parodontale.

Tabella 1 - Descrizione della popolazione

Parodontite	Totale	Affetti (%)
	728	77 (10%)
Uomini	305	42 (14%)
Donne	423	35 (9%)
Età (media ± ds)	46,82 ± 22,39	59,71 ± 13,46

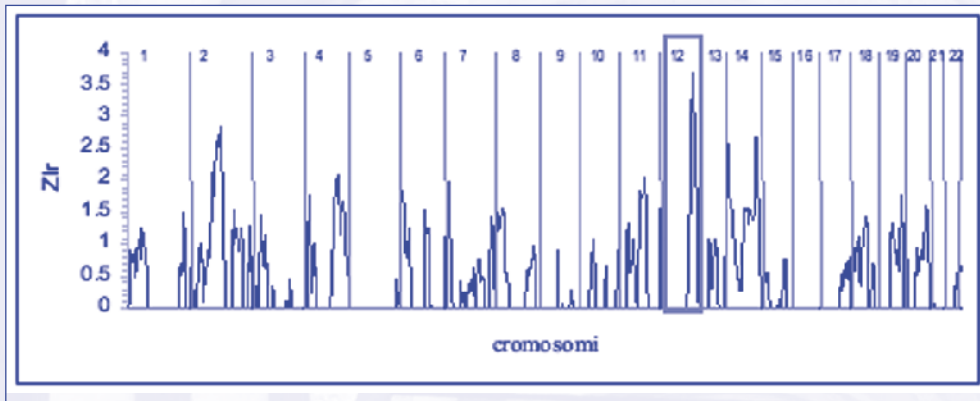


Fig. 1 - Distribuzione degli Zlr scores dell'analisi di linkage genome-wide

Tabella 2 - Zlr-score nella regione 12q24.31-12q24.32

Marcatore	Posizione (cM)	Zlr-score
D12S2073	144.137	2.84
D12S1614	148.984	3.65
D12S324	151.953	3.34
D12S2078	155.986	3.32
D12S1609	160.719	2.80

Bibliografia

1. Hart TC, Hart PS, Michalec MD, Zhang Y, Marazita ML, Cooper M, Yassin OM, Nusier M, Walker S. Localisation of a gene for prepubertal periodontitis to chromosome 11q14 and identification of a cathepsin C gene mutation. *J Med Genet.* 2000; 37(2): 95-101.
2. Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson Jr. T.G, Higginbottom FL & Duff G.(1997). The interleukin 1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease.*Journal of Clinical Periodontology* 24,72-77
3. Papapanou PN, Neiderud AM, Sandros J, Dahlén G. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *J Clin Periodontol.* 2001 May; 28(5): 389-396
4. Peltonen L, Palotie A, Lange K. Use of population isolates for mapping complex traits. *Nat Rev Genet.* 2000.
5. Colonna V, Nutile T, Ferrucci RR, Fardella G, Aversano M, Barbuiani G, Ciullo M Comparing population structure as inferred from genealogical versus genetic information. *Eur J Hum Genet.* 2009.
6. Gudbjartsson DF, Thorvaldsson T, Kong A, Gunnarsson G, Ingolfsdottir A. Allegro version 2. *Nat Genet.* 2005.
7. Falchi M, Fuchsberger C. Jenti: an efficient tool for mining complex inbred genealogies. *Bioinformatics.* 2008.
8. Ellen M. Wijsman, Joseph H. Rothstein, and Elizabeth A. Thompson Multipoint linkage analysis with many multiallelic or dense diallelic markers: Markov chain Monte Carlo provides practical approaches for genome scans on general pedigrees *American Journal of Human Genetics*, Nov 2006.
9. Nibali L, Tonetti MS, Ready D, Parkar M, Brett PM, Donos N, D'Aiuto F. Interleukin-6 polymorphisms are associated with pathogenic bacteria in subjects with periodontitis. *J Periodontol.* 2008.



Società Italiana
di Parodontologia



TRATTAMENTO DI DIFETTI INFRAOSSEI CON AMELOGENINE O MEMBRANE RIASSORBIBILI E RIEMPITIVI. STUDIO CLINICO RANDOMIZZATO CONTROLLATO CON RISULTATI DAI 7 A 14 ANNI DI MANTENIMENTO

S. Milani*, G. Rasperini*, M. Silvestri^o, V. Cattaneo§

*Unità di Parodontologia, Dip. Scienze Chirurgiche Ricostruttive e Diagnostiche, Università degli Studi di Milano - Fondazione IRCCS Cà Granda Policlinico Milano

^oLibero Professionista, Pavia

§Rep. di Parodontologia, Clinica Odontoiatrica, Università degli Studi di Pavia - Fondazione IRCCS San Matteo, Pavia

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2010

RIASSUNTO

Lo scopo di questo studio randomizzato controllato è di confrontare i risultati a lungo termine di denti parodontalmente compromessi trattati con gel di amelogenine (test) o rigenerazione tissutale guidata con membrane riassorbibili in associazione ad osso bovino deproteinizzato (controllo). I risultati hanno mostrato un'alta percentuale di successo in entrambi i gruppi, con un risultato lievemente migliore nei difetti trattati con amelogenine.

INTRODUZIONE

Lo scopo della terapia rigenerativa parodontale è la ricostituzione del tessuto di supporto del dente perso per malattia parodontale. La rigenerazione dell'apparato di supporto deve essere caratterizzata dalla formazione di nuovo cemento con inserzione di fibre collagene, nuovo osso alveolare e neoformazione del legamento parodontale. La letteratura mostra come sia il trattamento con amelogenine (EMD) (Hammarstrom et al. 1997, Rasperini et al. 2000) che la rigenerazione tissutale guidata (GTR) (Nyman et al. 1982, Gottlow et al. 1986) promuovono la rigenerazione del parodonto. Entrambi i metodi hanno dimostrato di ottenere risultati migliori del semplice lembo di accesso (Tonetti et al. 2004) e recenti revisioni della letteratura hanno confermato il buon esito clinico della combinazione del trattamento con membrane riassorbibili e osso bovino deproteinizzato (Sculean et al. 2008). Alcuni studi hanno già confrontato l'efficacia del trattamento con amelogenine con la rigenerazione tissutale guidata, senza evidenziare differenze significative tra i due gruppi (Silvestri et al. 2003, Sanz et al. 2004), mentre solo uno

studio di Sculean et al. pubblicato nel 2008 ha confrontato i risultati delle due tecniche a lungo termine. Scopo di questo studio è quindi il confronto tra i due trattamenti a lungo termine e la valutazione della possibile influenza delle variabili fumo ed igiene orale sul risultato. Come criteri di successo sono stati considerati la sopravvivenza dell'elemento dentario e il mantenimento del livello di attacco clinico ottenuto ad un anno dal trattamento chirurgico.

MATERIALI E METODI

Tra il 1996 e il 2002 sono stati trattati 60 pazienti con 86 gravi difetti infraossei in due centri clinici. Prima di essere coinvolti nel protocollo di studio ogni soggetto ha sottoscritto il consenso informato. I criteri d'inclusione nello studio sono stati: età superiore ai 21 anni, buono stato di salute generale, non utilizzo di antibiotici nei sei mesi precedenti la terapia, stato di evidente malattia parodontale precedentemente trattato con protocollo non chirurgico, indice di placca (FMPS) e indice di sanguinamento (FMBS) inferiori al 15%, componente infraossea superiore ai 4 mm valutata radiograficamente, livello di attacco clinico di almeno 8 mm, consumo di non più di 20 sigarette al giorno.

Tutti i pazienti prima della terapia hanno ricevuto le istruzioni di igiene orale e un trattamento di igiene professionale. Dopo quaranta giorni da questo primo trattamento sono stati rivalutati ed inseriti nel protocollo se concordi con i criteri d'inclusione. Prima della chirurgia è stato valutato per ogni difetto il valore di recessione (REC), di sondaggio parodontale (PPD) e di perdita di livello di attacco clinico (CAL).

In seguito, secondo criterio di randomizzazione su ogni singolo difetto, i pazienti al momento della terapia sono stati trattati con gel di amelogenine (EMD) o con rigenerazione tissutale guidata con membrane riassorbibili e innesto (GTR). Nel periodo dello studio le tecniche chirurgiche attuate si sono evolute in accordo con le direttive delle pubblicazioni scientifiche. L'accesso al difetto è stato ottenuto mediante Papilla Preservation Technique (PPT), Modified Papilla Preservation Technique (MPPT) e Simplified Papilla Preservation Technique (SPPT). A partire dal 1999 quando lo spazio interdentale era inferiore o uguale ai 2 mm è stata attuata la tecnica SPPT, mentre negli spazi interdentali superiori ai 2 mm è stata preferita la procedura MPPT. Nei pazienti appartenenti al gruppo test (EMD) in un primo momento è stata preparata una sutura Laurell-Gottlow e la superficie radicolare è stata condizionata con gel EDTA e solo successivamente si è proceduto con l'applicazione del gel di amelogenine sulla superficie radicolare. Nel gruppo controllo (GTR), dopo l'accurata pulizia del difetto, si è riempito il difetto con dell'innesto di osso bovino deproteneizzato protetto da una membrana riassorbibile sagomata in modo da coprire fino a 3 mm oltre l'area da rigenerare. Dopo aver completato questa fase si è proceduto alla chiusura del lembo con una sutura a materasso interno orizzontale e suture a punti staccati per le incisioni di scarico mesiali e distali.

Per le prime quattro settimane dopo la chirurgia si è chiesto ai pazienti di risciacquare due volte al giorno con una soluzione di clorexidina, utilizzando procedure modificate di igiene orale. In seguito i soggetti sono stati inseriti in un programma quadrimestrale di mantenimento dell'igiene orale, non tutti hanno partecipato interamente a questa fase terapeutica. La mancanza di partecipazione ai richiami quadrimestrali di igiene orale è stata valutata nell'analisi statistica.

Il valore di livello di attacco clinico è stato registrato ad un anno dalla terapia e ogni due anni a partire dalla fase chirurgica.

Le analisi statistiche sono state realizzate utilizzando il software Stata 11 (StataCorp. 2009) e sono state mirate sia alla valutazione della correlazione tra le variabili analizzate e il successo a lungo termine sia al confronto tra il gruppo test e il gruppo controllo. Sono state realizzate analisi Pearson per la correlazione semplice, analisi a modelli misti per l'andamento lineare del CAL nel tempo e analisi Kaplan-Meier con test Log-Rank e analisi di Cox per la valutazione del successo nel tempo confrontando i due gruppi. L'avulsione del dente trattato (AV) e la perdita di 2 o più mm di attacco clinico, rispetto al valore osservato dopo un anno dalla terapia, (CALfail) sono stati considerati criteri di fallimento, come precedentemente descritto da Cortellini e Tonetti nel 2004.

RISULTATI

Quarantanove casi sono stati trattati con EMD e 37 con GTR. L'età media dei pazienti nel gruppo test era di $44,7 \pm 10,6$ al momento della terapia, il 6,1 % dei pazienti del gruppo test erano fumatori e solo l'81,6 % ha partecipato completamente al programma di mantenimento dell'igiene orale. Nel gruppo controllo le precedenti variabili erano così rappresentate: $45,5 \pm 10,5$ anni, 10,8% fumatori e 83,3% partecipanti al programma di igiene orale. I valori medi di PPD, CAL e REC nel gruppo EMD erano rispettivamente: $7,7 \pm 2,0$, $8,3 \pm 2,2$ e $0,6 \pm 1,2$ mm, mentre nel gruppo GTR i valori erano i seguenti: $7,9 \pm 2,1$, $8,3 \pm 2,3$ e $0,4 \pm 0,9$ mm. I difetti sono stati controllati nel tempo e si è ottenuto il valore di CAL a 7 anni per tutti gli 86 difetti, a 9 anni per 70 casi, a 11 per 55 e a 13 per 21 difetti.

Solo tre denti sono stati estratti, due erano stati trattati con GTR, uno con EMD. Un dente era di un paziente fumatore (GTR), un altro di un paziente fumatore che non ha partecipato al programma di mantenimento dell'igiene orale (GTR) e l'ultimo di un paziente non fumatore che non ha partecipato al programma di mantenimento dell'igiene (EMD) (Tabella 1).

I test Log-Rank e Pearson hanno mostrato significatività statistica tra lo stato di fumatore e la possibilità di avulsione (rispettivamente $p = 0,001$ e $p = 0,022$) e hanno sottolineato la maggior probabilità statistica di avulsione nei pazienti che non hanno partecipato al programma di mantenimento (rispettivamente $p = 0,022$ e $p = 0,036$). L'analisi di Cox invece non ha portato a valori statisticamente significativi ($p = 0,18$ per fumo e $p = 0,12$ per non mantenimento dell'igiene orale), ma da tenere clinicamente in considerazione, specialmente se correlati alle precedenti analisi e ai dati presenti in letteratura.

L'analisi sul valore lineare del CAL ha mostrato un guadagno medio sull'intero campione di 4,16 mm, suddiviso in 4,46 mm di guadagno nel gruppo GTR e 3,94 mm di guadagno nel gruppo EMD. L'andamento del valore di CAL nel tempo è stato costante in entrambi i gruppi (Fig. 1, Tabella 1) e analizzando il valore di interazione si ottiene un valore p di 0,37 non statisticamente significativo, sottolineando come non ci sia differenza significativa tra test e controllo.

L'analisi Kaplan-Meier sulla sopravvivenza intesa come non avulsione dell'elemento (Tabella 3) ha mostrato una sopravvivenza sull'intero campione del 98,84% a 7 anni, del 97,45% a 9 anni e del 95,71% a 13 anni. La stessa analisi condotta nei gruppi ha mostrato il 100% di

sopravvivenza sino a 9 anni e il 96,43% dagli 11 ai 13 per il gruppo test, mentre nel controllo (GTR) si è ottenuto il 97,30% di successo a 7 anni e il 94,26% dai 9 ai 13 anni.

Lo stesso metodo Kaplan-Meier è stato eseguito intendendo come fallimento l'avulsione del dente o la perdita di 2 o più mm di CAL rispetto al valore ottenuto ad un anno della terapia (Tabella 4). Sull'intero campione a 7 anni si è ottenuto l'89,95 % di successo, a 9 l'88,18% e a 13 il 75,58%. L'analisi del gruppo test (EMD) ha mostrato l'89,9% di successo a partire dai 7 fino ai 13 anni, mentre il gruppo controllo (GTR) ha mostrato un valore di 89,19% a 7 anni, 86,22% a 9 e 11 anni e 64,66% a 13 anni. La Fig. 2 sottolinea in modo chiaro il diverso andamento dei due gruppi nel tempo quando è considerato come fallimento l'avulsione o la perdita del CAL ottenuto con la chirurgia.

DISCUSSIONE

Questo studio ha voluto comparare i risultati di 86 gravi difetti infraossei trattati in modo randomizzato con tecniche EMD o GTR. Le analisi hanno permesso di valutare i risultati a lungo termine per quanto riguarda la sopravvivenza dell'elemento dentario, il mantenimento del livello di attacco clinico guadagnato con la chirurgia e la variazione del valore di CAL nel tempo. Non tutti i pazienti hanno partecipato con regolarità ai richiami quadrimestrali di igiene orale, ma sono stati comunque richiamati ogni due anni per valutare il livello di attacco clinico. I dati mostrano come il trattamento rigenerativo dei difetti infraossei sia con amelogenine che con rigenerazione tissutale guidata porti ad una riduzione statisticamente significativa del CAL e dia la possibilità di mantenere l'elemento dentario con ottima possibilità di successo nel lungo periodo, entrambe le terapie infatti hanno dato il 96% di sopravvivenza a 13 anni. Questo risultato incoraggia fortemente la terapia rigenerativa poiché mostra come sia possibile cambiare positivamente la prognosi di denti parodontalmente compromessi, con alta probabilità di successo a lungo termine; è stato ottenuto il 100% di successo a 7 anni sull'intero campione e a 11 anni nel gruppo test con le amelogenine. L'analisi sul fallimento terapeutico (avulsione o perdita di 2 o più mm del CAL guadagnato con la terapia) mostra l'88% di successo a 11 anni sull'intero campione.

Entrambe le tecniche hanno dato un'alta percentuale di successo a lungo termine e non è stato possibile rilevare differenze statisticamente significative tra il gruppo test e il gruppo controllo, confermando quanto precedentemente espresso in letteratura (Silvestri et al. 2003, Sculean et al. 2008). Tuttavia, nonostante l'assenza di significatività statistica, si è osservato un risultato lievemente migliore nel gruppo test; le amelogenine hanno conseguito una più alta percentuale di successo con il 100% a 9 anni rispetto al 94,26% del gruppo controllo e questa differenza permane nel tempo anche se la percentuale di successo del gruppo EMD decresce al 96,43% a 11 e 13 anni. Valutando il successo con il criterio più restrittivo legato al CAL, si osserva come il gruppo test mostri risultati migliori con l'89,80% di successo a 11 anni contro l'86,22% del gruppo controllo della rigenerazione tissutale guidata.

Il valore di CAL osservato dopo la terapia chirurgica risulta lievemente migliore nel gruppo controllo, ma con l'andare del tempo la differenza tra i due gruppi tende a scomparire. Il gel di amelogenine è più adatto ai difetti contenitivi a tre pareti, ma a causa della randomizzazione

è stato utilizzato anche in difetti più ampi; questa considerazione può giustificare la migliore performance della GTR ad un anno dalla chirurgia rispetto alle amelogenine. Allo stesso modo il miglior risultato ottenuto nei casi controllo può essere motivato dalla migliore capacità di stabilizzare il coagulo delle membrane riassorbibili associate a innesti.

Riassumendo i dati precedentemente esposti si può affermare che la tecnica EMD sia un'alternativa valida e affidabile al rigenerazione tissutale guidata, in alcuni casi addirittura preferibile alla GTR grazie alla minor presenza di rischi chirurgici nel trattamento con amelogenine, quali l'eventualità dell'esposizione precoce della membrana riassorbibile.

I test di correlazione Log-Rank e Pearson hanno mostrato una significatività statistica tra le variabili fumo e igiene orale e il successo terapeutico. Confermando i dati presenti in letteratura, i risultati indicano che i pazienti fumatori incorrono in un maggior rischio di avulsione, mentre i pazienti che partecipano con regolarità al programma di mantenimento dell'igiene orale hanno più probabilità di successo a lungo termine.

Tabella 1 - Analisi dei fallimenti

Dente	Gruppo	Igiene Orale	Fumo	PPD 0	CAL 0	REC 0	CAL 1	Avulsione
25	GTR	Si	Si	8 mm	10 mm	2 mm	7 mm	7 anni
43	EMD	No	No	8 mm	8 mm	0 mm	4 mm	9 anni
11	GTR	No	Si	6 mm	6 mm	0 mm	5 mm	9 anni

Tabella 2 - Analisi dell'andamento del CAL

Gruppo	Anno	0	1	3	5	7	9	11	13
Totale	Casi	86	86	86	86	86	70	55	21
	CAL	8.3 mm	4.1 mm	3.9 mm	3.7 mm	3.8 mm	3.6 mm	3.5 mm	3.7 mm
	Dev. Std.	2.2 mm	1.2 mm	1.2 mm	1.0 mm	1.0 mm	1.0 mm	0.8 mm	1.1 mm
EMD	Casi	49	49	49	49	49	39	27	9
	CAL	8.3 mm	4.3 mm	4.0 mm	3.8 mm	3.8 mm	3.6 mm	3.5 mm	3.6 mm
	Dev. Std.	2.2 mm	1.2 mm	1.2 mm	0.8 mm	0.9 mm	0.8 mm	0.7 mm	0.7 mm
GTR	Casi	37	37	37	37	37	31	28	12
	CAL	8.3 mm	3.8 mm	3.8 mm	3.7 mm	3.6 mm	3.6 mm	3.4 mm	3.8 mm
	Dev. Std.	2.2 mm	1.2 mm	1.2 mm	1.2 mm	1.1 mm	1.1 mm	0.8 mm	1.3 mm

Tabella 3 - Analisi Kaplan-Meier, fallimento inteso come avulsione)

	Anni	Casi	Fallimenti	Sopravvivenza	Errore Std.	Intervallo di confidenza 95%
Totale	7	86	1	98,84%	0,012	92,03 % - 99,84 %
	9	71	1	97,45%	0,018	90,11 % - 99,36 %
	11	56	1	95,71%	0,025	87,06 % - 98,62 %
	13	21	0	95,71%	0,025	87,06 % - 98,62 %
EMD	7	49	0	100%	-	-
	9	39	0	100%	-	-
	11	28	1	96,43%	0,035	77,24 % - 99,49 %
	13	9	0	96,43%	0,035	77,24 % - 99,49 %
GTR	7	37	1	97,30%	0,027	83,23 % - 99,61 %
	9	32	1	94,26%	0,040	78,87 % - 98,54 %
	11	28	0	94,26%	0,040	78,87 % - 98,54 %
	13	12	0	94,26%	0,040	78,87 % - 98,54 %

Tabella 4 - Analisi Kaplan-Meier, fallimento inteso come avulsione o perdita di almeno 2 mm di CAL rispetto al valore ottenuto ad un anno dalla terapia

	Anni	Casi	Fallimenti	Sopravvivenza	Errore Std.	Intervallo di confidenza 95%
Totale	3	86	2	97,67%	0,016	91,02 % - 99,41 %
	5	86	5	91,86%	0,030	83,68 % - 96,03 %
	7	86	2	89,53%	0,033	80,85 % - 94,41 %
	9	71	1	88,18%	0,035	79,12 % - 93,47 %
	11	56	0	88,18%	0,035	79,12 % - 93,47 %
	13	21	3	75,58%	0,074	57,44 % - 86,82 %
EMD	3	49	1	97,96%	0,020	86,38 % - 99,71 %
	5	48	3	91,84%	0,040	79,70 % - 96,86 %
	7	45	1	89,80%	0,043	77,21 % - 95,62 %
	9	36	0	89,80%	0,043	77,21 % - 95,62 %
	11	26	0	89,80%	0,043	77,21 % - 95,62 %
	13	9	0	89,80%	0,043	77,21 % - 95,62 %
GTR	3	37	1	97,30%	0,027	82,32 % - 99,61 %
	5	36	2	91,89%	0,045	76,93 % - 97,31 %
	7	34	1	89,19%	0,051	73,71 % - 95,80 %
	9	30	1	86,22%	0,057	69,96 % - 94,03 %
	11	28	0	86,22%	0,057	69,96 % - 94,03 %
	13	12	3	64,66%	0,012	37,65 % - 82,32 %

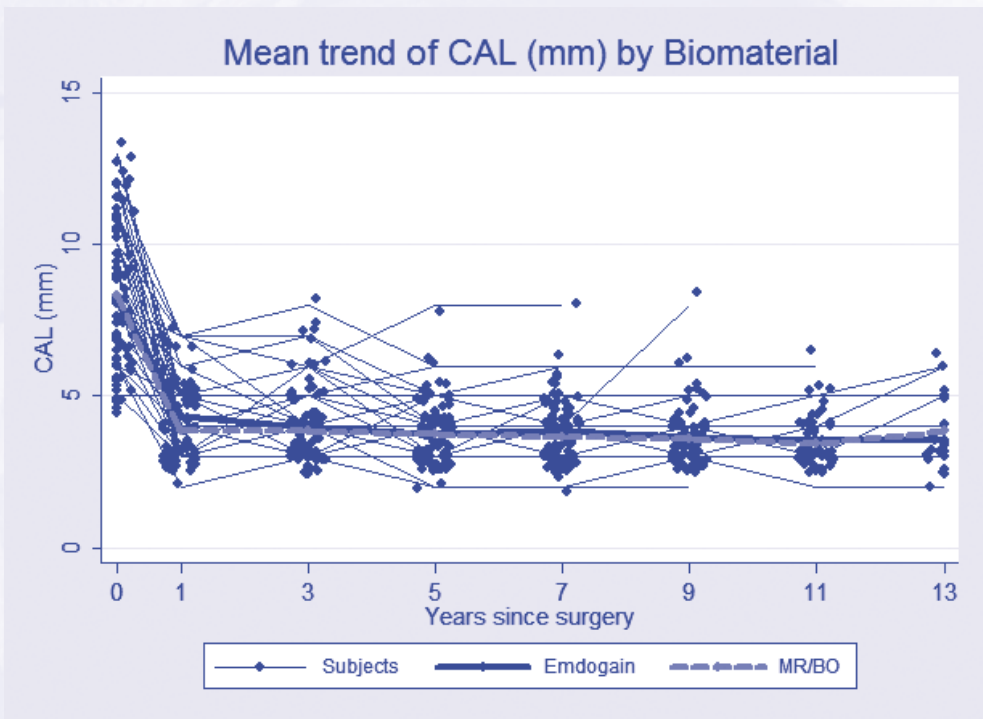


Fig. 1 - Andamento del CAL a seconda della tecnica utilizzata

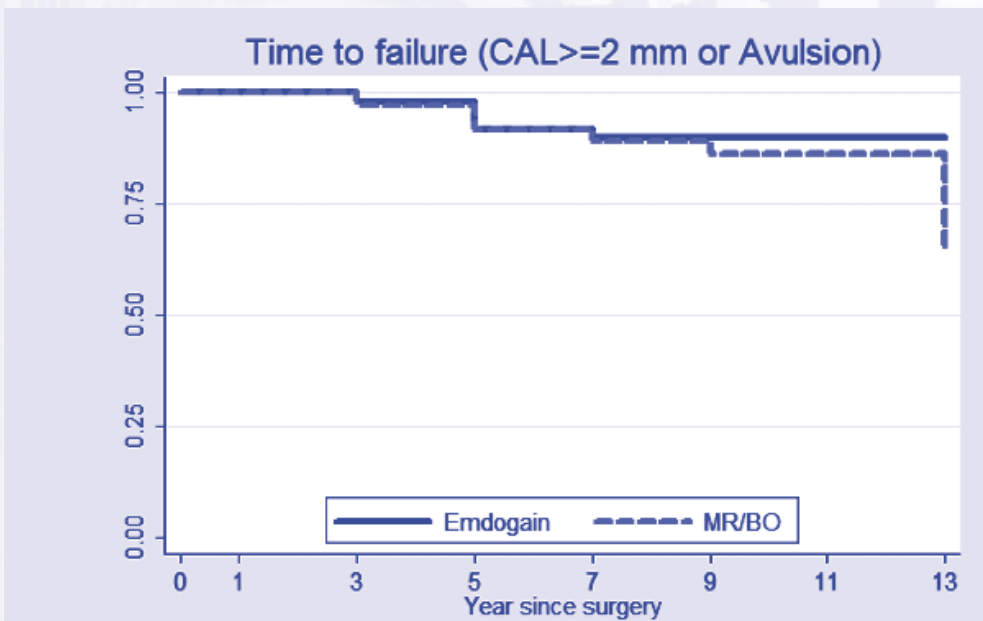


Fig. 2 - Analisi Kaplan-Meier, fallimento inteso come avulsione o perdita di 2 o più mm del CAL ottenuto con la chirurgia

BIBLIOGRAFIA

1. Cortellini P, Tonetti MS. (2004) Long-term tooth survival following regenerative treatment of intrabony defects. *Journal of Periodontology* 75, 672-678.
2. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström, J. (1986) New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *Journal of Clinical Periodontology* 13, 604-616.
3. Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S. (1997) Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *Journal of Clinical Periodontology* 24, 669-677.
4. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. (1982) New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 9, 290-296.
5. Rasperini G, Silvestri M, Schenk RK, Nevins ML. (2000) Clinical and histological evaluation of human gingival recession treated with a subepithelial connective tissue graft and enamel matrix derivative (Emdogain): a case report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 20, 269-275.
6. Sanz M, Tonetti MS, Zabalegui I, Sicilia A, Blanco J, Rebelo H, Rasperini G, Merli M, Cortellini P, Suvan JE. (2004) Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or barrier membranes: results from a multicenter practice-based clinical trial. *Journal of Periodontology* 75, 726-733.
7. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. (2008) Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials – biological foundation and preclinical evidence. A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* 35, (Suppl. 8): 106–116.
8. Sculean A, Kiss A, Miliuskaite A, Schwarz F, Arweiler NB, Hannig M. (2008) Ten-year results following treatment of intra-bony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* 35, 817-24.
9. Silvestri M, Sartori S, Rasperini G, Ricci G, Rota C, Cattaneo V. (2003) Comparison of intrabony defects treated with enamel matrix derivative versus guided tissue regeneration with a nonresorbable membrane. *Journal of Clinical Periodontology* 30, 386-393.
10. Tonetti MS, Cortellini P, Lang NP, Suvan JE, Adriaens P, Dubravec D, Fonzar A, Fourmouis I, Rasperini G, Rossi R, Silvestri M, Topoll H, Wallkamm, B, Zybutz M. (2004) Clinical outcomes following treatment of human intrabony defects with GTR/bone replacement material or access flap alone. A multicenter randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* 31, 770-776.



PREMIO
HM GOLDMAN



SIP
Società Italiana
di Parodontologia



DIFFERENZIAZIONE, APOPTOSI ED ESPRESSIONE DI GM-CSFR α DI FIBROBLASTI GENGIVALI UMANI SU DIFFERENTI SUPERFICI IN TITANIO

G. Capece, L. Postiglione, G. Di Spigna, R. Saviano, L. Ramaglia

Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali, Napoli

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2010

RIASSUNTO

Le caratteristiche di superficie di un impianto dentario in titanio sembrano in grado di modulare l'espressione fenotipica e l'attività cellulare, influenzando la guarigione dei tessuti perimplantari. I dati in letteratura inerenti l'effetto della topografia superficiale sulla regolazione cellulare dei fibroblasti sono limitati. Scopo del presente studio è stato valutare in vitro il comportamento biologico di fibroblasti gengivali umani coltivati su due diverse superfici in titanio. I risultati hanno evidenziato differenti effetti della microtopografia di superficie sulla differenziazione ed espressione cellulare.

INTRODUZIONE

Il successo a lungo termine di un impianto dentario dipende dal raggiungimento di un ottimale livello di osteointegrazione e da una favorevole interazione della fixture con i tessuti molli circostanti¹. Studi sperimentali² hanno dimostrato che le caratteristiche di superficie implantare possono avere un effetto significativo nei confronti del comportamento cellulare, influenzandone espressione fenotipica ed attività metabolica. Scopo del presente studio è stato valutare in vitro il comportamento di fibroblasti gengivali umani (Human Gingival Fibroblasts - HGF) coltivati su due differenti superfici in titanio attraverso l'analisi di adesione, proliferazione, produzione di matrice extracellulare ed apoptosi. E' stata inoltre valutata l'espressione del recettore per il Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor (GMCSF), un fattore di crescita coinvolto nel controllo dell'attività metabolica di diversi stipiti cellulari tra cui i fibroblasti gengivali.

PREMIO
HM GOLDMAN

MATERIALI E METODI

Dischi di titanio

Dischi di titanio commercialmente puro (1 cm in diametro e 1,5 mm in spessore) (Biomet 3i, Palm Beach, USA) con due differenti superfici sono stati impiegati nello studio. I dischi sono stati preparati con una superficie liscia (Smooth - S) o con una superficie rugosa ottenuta con procedura di doppia mordenzatura acida (Double Acid Etched - Osseotite - O) con acido cloridrico/solfurico. La rugosità di superficie è stata analizzata con profilometro ottico Micro-XAM (ADE Phase Shift, Tucson, USA).

L'indice di rugosità S_a della superficie S risultava $0.33 \mu\text{m}$, comparata a $0.5 \mu\text{m}$ della Superficie O. I dischi sono stati ottenuti da titanio cp di grado 4 (0.05% N, 0.10% C, 0.015% H, 0.5% Fe, 0.4% O, 98.935% Ti). I campioni sono stati sottoposti a trattamento routinario di decontaminazione superficiale ed autoclavati prima degli esperimenti di coltura cellulare.

Colture cellulari

Frammenti di biopsie gengivali umane effettuate nel corso di interventi di chirurgia orale in soggetti sani, giovani e non trattati farmacologicamente, sono stati preparati sotto microscopia ottica e poi trattati enzimaticamente con collagenasi per 30 min a 37°C . Dopo ripetuti lavaggi con soluzione salina fosfato tamponata (Phosphate-Buffered Saline - PBS; Gibco, Grand Island, USA), i frammenti sono stati coltivati in piastre con mezzo di coltura Dulbecco modificato (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM; Sigma, St. Louis, USA) con 50% di Siero Fetale Bovino (Fetal Calf Serum - FCS; Gibco) inattivato a 37°C in 5% di CO_2 . Dopo circa 10 giorni è stato effettuato il primo cambio di mezzo con concentrazioni scalari di FCS. A circa un mese di distanza, le colture primarie di fibroblasti gengivali umani così ottenute sono state coltivate in DMEM supplementato con 10% di FCS, 200mM di Lglutammina, penicillina (100 mg/ml) e streptomina (100 mg/ml) (Gibco). Le piastre sono state incubate in incubatore umidificato con 95% di aria e 5% di CO_2 a 37°C . Il mezzo è stato rinnovato ogni tre giorni.

Per ogni esperimento 1.5×10^6 cellule sono state poste in coltura sui dischi in piastre di plastica di 60 mm di diametro (Sarsted, Newton, USA). Gli esperimenti sono stati eseguiti in quadruplicato e ripetuti 3 volte.

Microscopia elettronica a scansione

Le superfici dei dischi in titanio sono state analizzate con microscopia elettronica a scansione (Scanning Electron Microscopy - SEM) a 600 ingrandimenti. Esperimenti preliminari sono stati eseguiti per valutare morfologia cellulare e tempi di subconfluenza e confluenza su entrambe le superfici. Le cellule sono state coltivate in triplicato sui dischi fino a 96 ore. I dischi sono stati rimossi dal mezzo di coltura, lavati lentamente con PBS e fissati ai tempi stabiliti, prima con l'1% di glutaraldeide in tampone fosfato 0.1M a pH 7.3 per 1 ora ed una seconda volta con l'1% di tetrossido di osmio in tampone caco dilato 0.1M, pH 7.4 per 1 ora. Sono stati lavati con PBS tre volte, disidratati in concentrazioni scalari di etanolo (30%, 50%, 70% e 90%), posti in etanolo 100% e risciacquati per 30 min 3 volte. Sono stati essiccati al punto critico, montati su supporti in rame e dunque introdotti in camera di metallizzazione e ricoperti d'oro. Le superfici sono state

infine osservate con il SEM (JSM-6700F, JEOL Ltd, Japan) ad un voltaggio di 5 kV.

Adesione cellulare HGF sono stati coltivati per due giorni in presenza di 3H-Timidina 10 μ Ci/ml su piastre di coltura in plastica di 60 mm di diametro (Sarsted) fino a confluenza del 50%. Le cellule sono state dunque raccolte e quelle marcate con 3H-Timidina contate con contatore (Beckman LS 5000, Milano, Italy). Le cellule sono state piastrate sui dischetti in titanio ed incubate per 3 ore a 37°C, 5% CO₂. I dischetti sono stati poi lavati con PBS e trasferiti in contatore a scintillazione liquida (Wallac, Milton Keynes, UK). Il numero di cellule adese alle due superfici in titanio è stato valutato misurando la radioattività, espressa in colpi/minuto, normalizzata per il numero di cellule.

Proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è stata analizzata con test di riduzione dei sali di tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliobromuro - MTT; Sigma) attraverso analisi spettrofotometrica. Le cellule sono state raccolte per tripsinizzazione e piastrate sui dischetti in titanio; il numero di cellule vitali è stato determinato dal test MTT a 24, 72 e 96 ore, a 7 e 14 giorni. I dischetti sono stati rimossi dalle piastre di coltura in plastica e trasferiti in multi-well; è stato aggiunto MTT (5 ng/mL) ad ogni pozzetto e le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C. Il colorante è stato eluito dai dischetti con isopropanolo acidificato e la densità ottica è stata misurata con uno spettrofotometro (Beckman DU-40, Milano, Italy) a 570 nm di lunghezza d'onda. I dischetti senza cellule ed il solo mezzo di coltura sono stati utilizzati come controlli negativi.

Deposizione di ECM: analisi immuno-enzimatica in situ

Un'analisi quantitativa della produzione di alcune proteine della matrice extracellulare come Collagene I (Collagen type I - Col), Fibronectina (Fibronectin - FN), e Tenascina (Tenascin - TN) è stata condotta attraverso analisi immunoenzimatica (ELISA) in situ. Le cellule HGF sono state piastrate sulle superfici in titanio e coltivate fino a 14 giorni. A tempi determinati (24, 72 e 96 ore, 7 e 14 giorni) le cellule sono state fissate sui dischetti in titanio con 50% (vol/vol) di metanolo/acetone per 10 min a temperatura ambiente ed essiccate. I dischetti sono stati incubati in PBS/0.5% di siero albumina bovina (Bovine Serum Albumin - BSA), per 2 ore a 4°C; successivamente sono stati aggiunti 50 μ l di uno degli antisiero di coniglio, anti-collagene I, anti-fibronectina o anti-tenascina (Chemicon, Temecula, USA), in PBS/0.5% di BSA e 0.2% di Tween 20 e lasciati reagire per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate con PBS, saturate con 50 μ l di anti IgG di coniglio coniugate a perossidasi di rafano in PBS con 0.2% di Tween 20, lasciate reagire per 1 ora, lavate di nuovo con PBS ed addizionate con 150 μ l di 1mg/mL o-fenilendiamina, 0.006% di perossido di idrogeno, 0.1 M tampone citrato, a pH 5.0.

Dopo 30 min di incubazione, l'assorbanza a 450 nm è stata misurata con spettrofotometro. Dischetti senza cellule e dischetti ricoperti di matrice extracellulare purificata sono stati utilizzati come controllo.

Apoptosi cellulare

Per l'analisi dell'apoptosi è stata utilizzata la colorazione con propidio ioduro. Le cellule HGF, poste in piastre su superfici in titanio e coltivate fino a 96 ore, sono state raccolte per tripsinizzazione, deterse e lavate due volte con PBS, fissate e permeabilizzate con etanolo freddo al 70%, e poi conservate a 4°C. E' stato poi aggiunto 1-mL di soluzione colorante di propidio ioduro (50 µg/mL in PBS, pH 7.4) contenente 0.5 mg/mL di RNase DNase-free, ed il contenuto in DNA delle cellule analizzato con citofluorimetria di flusso (FACScan, Beckton Dickinson, Mountain View, USA). L'analisi dell'apoptosi è stata ottenuta attraverso l'uso del software CELL LYSIS.

Espressione del recettore GM-CSF mediante Western blot

L'espressione della subunità di legame α del recettore per il GM-CSF è stata valutata mediante metodica Western blot. Le cellule lisate sono state raccolte dai dischi di titanio e centrifugate a 14000 giri/min a 4°C. Sono stati raccolti i sovranatanti e la concentrazione proteica nelle cellule lisate è stata determinata attraverso saggio colorimetrico (BioRad, Richmond, USA). Per ogni campione, 100 µg di proteine totali sono state incubate per 5 min a 90°C in campione tampone Laemmli e separate con elettroforesi su filtri di polivinildene fluoride (PVDF - Millipore, Bedford, USA); le membrane sono state bloccate con soluzione contenente 5% di latte in polvere scremato (BioRad, Richmond, USA), 1% di ovoalbumina (Sigma), 5% di FCS e 7,5% di glicina per 30 min a temperatura ambiente. Dopo 3 passaggi in soluzione di lavaggio (PBS / 0.1% di ovoalbumina, 0.1% di latte in polvere scremato, 1% di FCS), le membrane sono state incubate per una notte a 4°C con lo specifico anticorpo monoclonale anti-GM-CSFR α (Serotec, Oxford, UK). Dopo 5 lavaggi di 5 min, a temperatura ambiente, con soluzione di lavaggio, le membrane sono state incubate per 30 min a temperatura ambiente con anticorpo secondario coniugato a perossidasi di rafano (Zymed, San Francisco, USA), diluito a 1:3000 in PBS. Dopo 3 passaggi in soluzione di lavaggio e 3 lavaggi finali in T-TBS (50mM Tris, pH 7.5; 0.5M di NaCl; 0.2% di Tween 20), le membrane sono state colorate con kit per analisi della chemoluminescenza (enhanced chemoluminescence - ECL - detection kit; Amersham, Little Chalfont, UK). Un'analisi quantitativa è stata eseguita con Scanner Densitometrico (Agfa Snapscan 1212, Agfa-Gevaert, Mortsel, BE).

Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati espressi come media +/- D.S. Gli esperimenti sono stati eseguiti in quadruplicato e ripetuti 3 volte (n=12). L'analisi statistica è stata realizzata con il t-test di Student, e le differenze sono state considerate statisticamente significative per valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

Morfologia cellulare

L'analisi SEM ha rivelato che i fibroblasti dimostrano una buona adesione e proliferazione su entrambe le superfici, pur rivelando alcune differenze. Sulla superficie liscia le cellule si mostrano appiattite e distribuite con un organizzato network di filamenti di actina; sulla superficie rugosa si presentano meno distribuite con una ridotta trama actinica ma numerosi corti processi cellulari.

Adesione cellulare

L'adesione cellulare, valutata attraverso marcatura cellulare con 3H-Timidina, ha mostrato a 3 ore un rilevante numero di elementi cellulari su entrambe le superfici con una maggiore consistenza sulla superficie S statisticamente non significativa (Fig. 1A).

Proliferazione cellulare

Per entrambe le superfici il numero di cellule è aumentato gradualmente durante il periodo di coltura raggiungendo il picco nell'ultimo giorno di osservazione (14 giorni). L'aumento per entrambe le superfici, rispetto alla baseline a 24 ore, è statisticamente significativo a 96 ore, 7 e 14 giorni. Pur essendoci un maggiore incremento di proliferazione sulla superficie liscia, la differenza tra le curve di proliferazione delle due superfici in esame non risulta statisticamente significativa (Fig. 1B).

Produzione di matrice extracellulare ed espressione di GM-CSFR α

All'analisi ELISA in situ (Figg. 2A, 2B e 2C) le proteine di matrice Col, FN e TN risultano progressivamente prodotte tra 1 e 14 giorni su entrambe le superfici con una maggiore espressione di Col e FN sulla superficie O ed una maggiore produzione di TN sulla superficie S ma senza differenze statisticamente significative tra le superfici esaminate. L'analisi Western Blot utilizzata per la determinazione del recettore per il GM-CSF (Fig. 2D), ne ha evidenziato l'espressione su HGF coltivati su entrambe le superfici con maggiore rilievo a 14 giorni sulla superficie O.

Apoptosi

L'analisi dell'apoptosi dei fibroblasti coltivati con propidio ioduro ha evidenziato tale fenomeno su entrambe le superfici. Il maggior numero di eventi sulla superficie S non è statisticamente significativo (Fig. 1C).

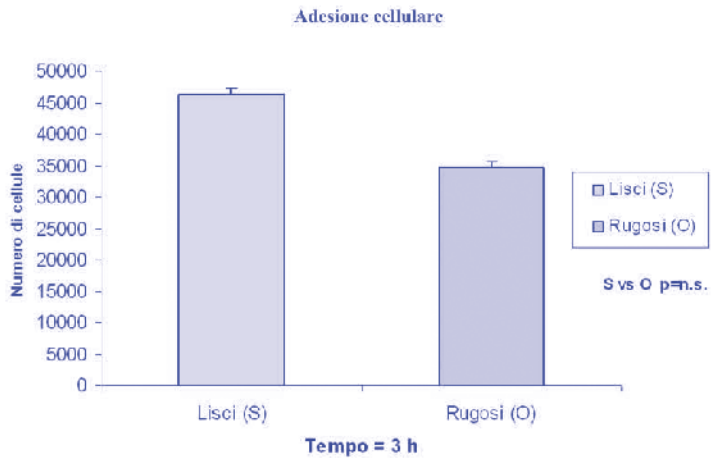
DISCUSSIONE

Il successo a lungo termine di un impianto dentario dipende dall'integrazione con i tessuti duri e molli circostanti¹. Numerosi studi sperimentali dimostrano che le caratteristiche di superficie di un impianto sono in grado di influenzare il comportamento cellulare². Mentre è ben studiata l'interazione tra osteoblasti e superfici implantari, limitati sono i dati in letteratura concernenti i rapporti tra fibroblasti e topografia superficiale implantare. La maggior parte degli studi^{3,4} verte su un'analisi istomorfometrica del tessuto connettivo perimplantare e non evidenzia differenze significative nella morfologia e composizione tissutale della mucosa al variare della microtopografia implantare. Le indagini in vitro inerenti il comportamento in coltura dei fibroblasti su differenti superfici di titanio sembrano mostrare un comportamento diverso rispetto a quello rilevato per lo stipite osteoblastico. Mustafa et al.⁵ hanno valutato in vitro l'adesione di fibroblasti umani su superfici in titanio sabbiato con particelle di TiO₂ di diametro crescente, dimostrando una più alta percentuale di attacco cellulare sulle superfici lisce e su quelle sabbiato con particelle di minor diametro. Kononen et al.⁶ hanno dimostrato che il numero di fibroblasti a 7 giorni risultava almeno 3 volte più elevato su superfici lisce rispetto a quelle trattate.

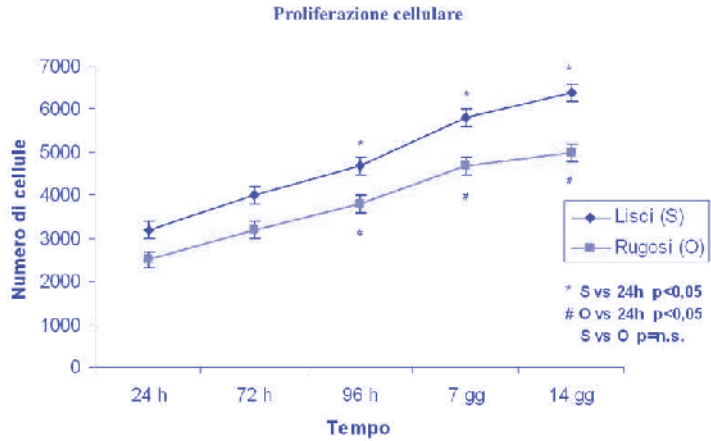
Grossner-Schreiber et al.⁷ hanno osservato che la formazione di contatti focali di adesione avveniva su tutte le superfici trattate prese in esame, ma diminuiva all'aumentare del grado di rugosità. Kunzler et al.⁸, in uno studio sulla risposta di osteoblasti e fibroblasti con l'utilizzo di gradienti di rugosità, hanno evidenziato per gli osteoblasti un significativo incremento del tasso di proliferazione all'aumentare della rugosità, diversamente dai fibroblasti che presentavano un comportamento proliferativo opposto, con un decremento all'aumentare della rugosità. Nel presente studio è stato valutato in vitro il comportamento di fibroblasti gengivali umani su due differenti superfici in titanio: liscia e rugosa per doppia mordenzatura acida con valori di Sa rispettivamente di 0.33 μm e 0.5 μm . Per quanto concerne l'adesione e la proliferazione cellulare i nostri risultati hanno evidenziato rispettivamente a 3 ore e da 24 ore a 14 giorni un maggior numero di cellule sulla superficie S. In particolare l'incremento cellulare a 96 ore, 7 e 14 giorni è statisticamente significativo rispetto al baseline su entrambe le superfici sebbene il confronto tra le due curve non risulti statisticamente significativo ai tempi sperimentali. Analogo effetto superficie si è riscontrato nell'analisi dell'apoptosi cellulare. Tali osservazioni potrebbero essere legate al grado di rugosità della superficie trattata da noi presa in esame che, secondo la classificazione di Albrektsson & Wennerberg⁹, si classificherebbe come minimamente rugosa in quanto con valore Sa compreso tra 0.5 e 1 μm . Allo scopo di valutare la differenziazione cellulare, è stata analizzata la produzione delle proteine dell'ECM Col, FN e TN. Esse sono risultate progressivamente prodotte tra 1 e 14 giorni di coltura su entrambe le superfici, con una maggiore espressione, statisticamente significativa, di Col e FN sulla superficie O, evidenziando su tale superficie una più marcata espressione di indicatori di maturazione ed organizzazione strutturale. La differenziazione cellulare dei fibroblasti è modulata anche da fattori di crescita tra cui il GM-CSF, un polipeptide di 127 amminoacidi che promuove e controlla l'attività cellulare¹⁰. L'espressione della subunità α del recettore per il GM-CSF nelle cellule coltivate sulle due superfici in titanio sembra indicare una possibile azione di tale fattore di crescita sull'attività metabolica dei fibroblasti gengivali umani lasciando ipotizzare un suo probabile ruolo nella regolazione di specifiche funzioni biologiche nell'ambito del tessuto mucoso perimplantare. In conclusione i dati riportati indicano che in vitro sia la superficie S che la superficie O mostrano un'interazione favorevole con i fibroblasti gengivali umani, promuovendone proliferazione e differenziazione cellulare e suggeriscono che la microtopografia di una superficie a doppia mordenzatura acida possa favorire una maggiore produzione di Collagene e Fibronectina, indicatori di maturazione ed organizzazione strutturale. Inoltre l'espressione del recettore per il GM-CSF evidenzia il possibile ruolo del fattore di crescita nell'interazione tra fibroblasti gengivali e differenti microtopografie di superfici in titanio. Ulteriori studi sono necessari per confermare queste ipotesi.

Figura 1

A



B



C

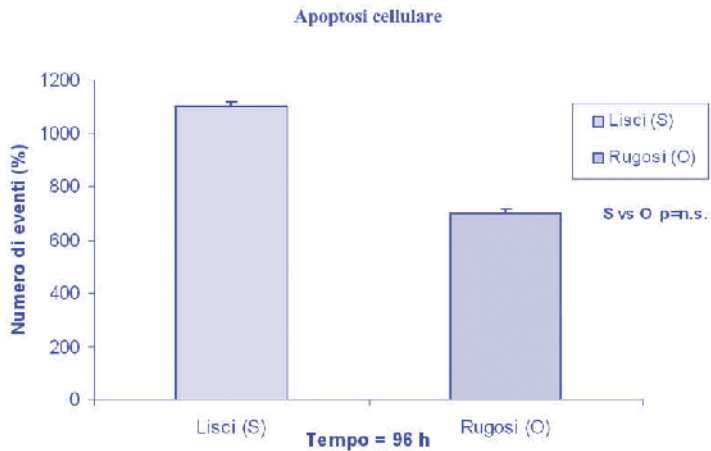
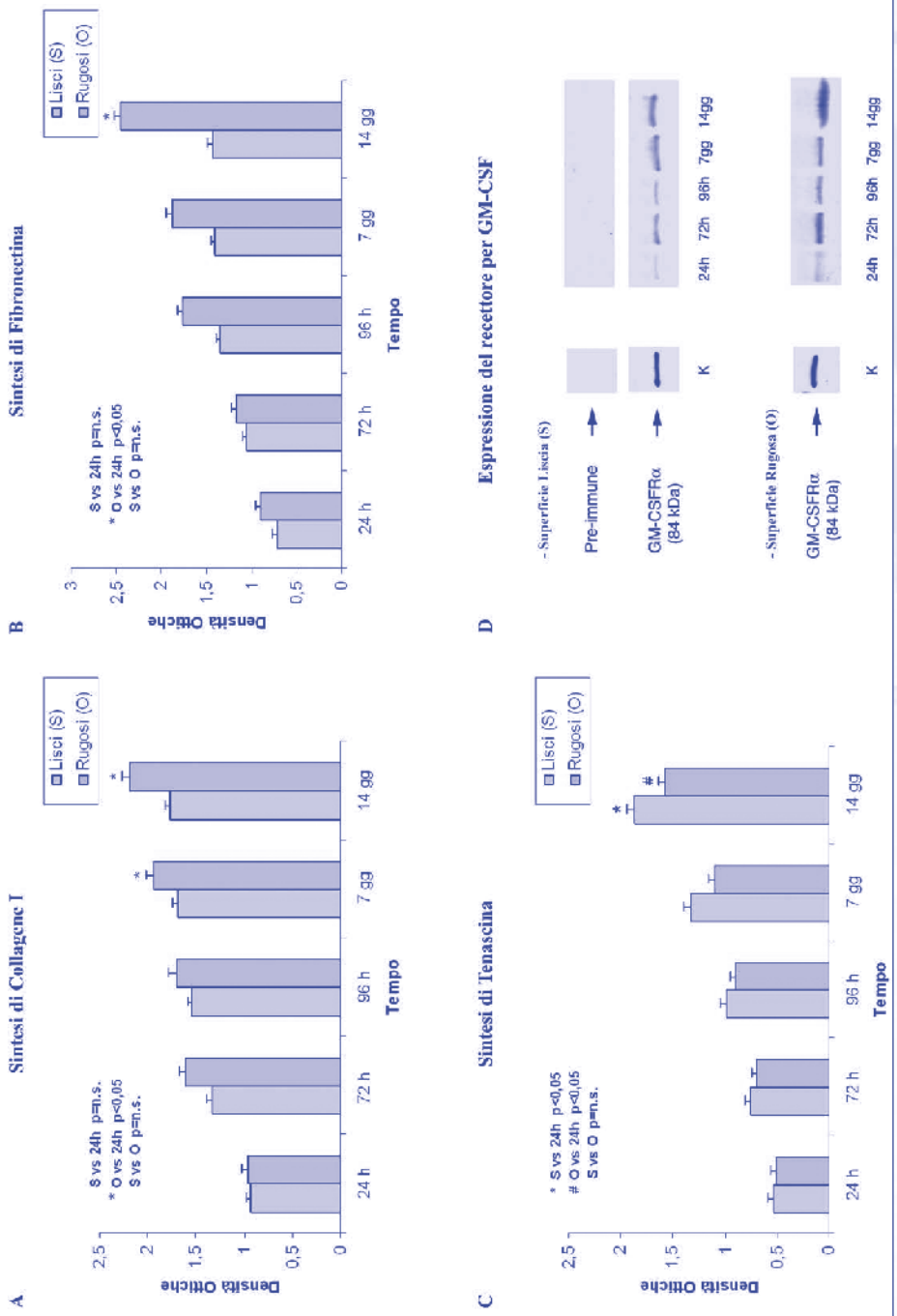


Figura 2



BIBLIOGRAFIA

1. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Research* 1991; 2: 81-90.
2. Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behaviour of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988; 3: 231-246.
3. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16: 323-332.
4. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 448-455.
5. Mustafa K, Silva Lopez B, Hultenby K, Wennerberg A, Arvidson K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implant Res* 1998; 9: 195-207.
6. Kononen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 1325-41.
7. Grossner-Schreiber B, Herzog M, Hedderich J, Duck A, Hannig M, Griepentrog M. Focal adhesion contact formation by fibroblasts cultured on surface modified dental implants: an in vitro study. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 736-745.
8. Kunzler TP, Drobek T, Schuler M, Spencer ND. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* 2007; 28: 2175-2182.
9. Postiglione L, Montagnani S, Riccio A, Ladogana P, Salzano S, Vallefucio L, Rossi G. Expression of GM-CSF receptor and "in vitro" effects of GM-CSF on human fibroblasts. *Life Sci.* 1998; 63: 327-36.
10. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1-review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004; 17(5): 536-43.



PREMIO
HM GOLDMAN



SIP
Società Italiana
di Parodontologia



ANALISI RADIOGRAFICA DELLA PERDITA OSSEA MARGINALE DI IMPIANTI SINGOLI NEI PAZIENTI NON FUMATORI PARODONTALMENTE COMPROMESSI TRATTATI E NEI PAZIENTI NON FUMATORI PARODONTALMENTE SANI. STUDIO RETROSPETTIVO CONTROLLATO A 10 ANNI

V. Iorio Siciliano*, G. Rasperini[#], C. Cafiero*, M. Aglietta[§], A. Blasi*,
S. Matarasso*, G.E. Salvi[§], N.P. Lang[°]

*Università degli Studi di Napoli Federico II; [#]Università degli Studi di Milano; [§]Università di Berna; [°]Università di Hong Kong

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2010

RIASSUNTO

Lo scopo del lavoro è quello di verificare, dopo un follow-up di 10 anni, la perdita ossea marginale di impianti singoli inseriti in pazienti non fumatori parodontalmente compromessi trattati (PCP) paragonandola con quella dei pazienti non fumatori parodontalmente sani (PHP). Dopo un follow-up di 10 anni è stata registrata una perdita ossea marginale maggiore ed una survival rate inferiore per gli impianti inseriti nei PCP rispetto agli impianti inseriti nei PHP.

INTRODUZIONE

La riabilitazione protesica dei pazienti edentuli, mediante l'utilizzo di impianti singoli, è da considerarsi una metodica predicibile nel lungo termine sia nei pazienti parodontalmente sani (Jung et al 2008) che in quelli parodontalmente compromessi (Mengel et al 2007, Ong et al 2008). Sebbene la sopravvivenza implantare nei pazienti parodontalmente compromessi sia elevata, tuttavia è stato dimostrato che la parodontite, specie se non trattata, è da considerarsi come un fattore di rischio e per la peri-implantite (Lindhe & Meyle 2008) e per la perdita dell'impianto (Renvert & Persson 2009). Dopo 10 anni di follow-up è stata osservata una percentuale di sopravvivenza implantare più bassa nei pazienti parodontopatici (90.5%) rispetto ai pazienti sani (96.5%) (Karussis et al 2003), mentre uno studio condotto da Hardt ha dimostrato che la perdita ossea marginale è stata maggiore nei pazienti parodontalmente compromessi (2.2 mm) rispetto ai pazienti sani (1.7

mm) (Hardt et al 2002). Mengel & Flores-de-Jacoby hanno inoltre dimostrato che la perdita ossea marginale perimplantare varia a seconda del tipo di parodontite ed è maggiore nei pazienti affetti da parodontite aggressiva generalizzata rispetto ai pazienti affetti da parodontite cronica generalizzata dopo un follow-up di 3 anni (Mengel & Flores-de-Jacoby 2005). È stato inoltre osservato che l'associazione della parodontite con altri fattori di rischio come la scarsa igiene orale, il fumo ed il diabete mellito aumenta il rischio di perimplantite e di perdita dell'impianto (Heitz-Mayfield et al 2008). Purtroppo non esistono studi a lungo termine mirati che paragonino la sopravvivenza implantare e la perdita ossea marginale di impianti inseriti in pazienti parodontalmente compromessi e in pazienti parodontalmente sani escludendo altri fattori di rischio (es. fumo). Quindi lo scopo di questo studio retrospettivo controllato radiografico è stato quello di valutare, dopo 10 anni di follow-up, la perdita di osso marginale (BL=bone loss) e la sopravvivenza (SR=survival rate) di impianti singoli con corona singola, inseriti in pazienti non fumatori parodontalmente compromessi e trattati (PCP = periodontally compromised patients) confrontandola con pazienti non fumatori parodontalmente sani (PHP = periodontally healthy patients). La perdita di osso marginale perimplantare (BL=bone loss) è stata considerata come primary outcome.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato disegnato come studio retrospettivo controllato radiografico a lungo termine (10 anni di follow-up). Da un centro universitario (Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali, Università degli Studi di Napoli "Federico II" e da un centro odontoiatrico privato (Studio Odontoiatrico "Dott. Giulio Rasperini" sono state selezionate le cartelle cliniche e le radiografie endorali di 80 pazienti (40 pazienti per centro) in cui sono stati inseriti 80 impianti (1 impianto/paziente). Sono stati inclusi nello studio pazienti parodontalmente compromessi trattati (parodontite cronica generalizzata trattata) e pazienti parodontalmente sani, ambo sessi, di età ≥ 18 anni, riabilitati con un impianto singolo sommerso con corona singola (superficie machined) o transmucoso (superficie TPS) tra Giugno 1997 e Luglio 1997.

Tutti i pazienti arruolati per lo studio dovevano aver ricevuto un carico protesico convenzionale (3-6 mesi) e dovevano aver seguito in programma di mantenimento parodontale. Per poter far parte del campione di studio i pazienti dovevano avere una radiografia endorale eseguita con tecnica del cono lungo e anello di Rinn al momento della riabilitazione protesica e durante il follow-up. Gli impianti dovevano essere inseriti in selle edentule di un elemento con la presenza di un elemento dentario mesiale ed uno distale. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con qualsiasi patologia sistemica, i fumatori e gli ex-fumatori, i pazienti con un FMPS ed un FMBS $\geq 25\%$ (calcolato su quattro siti), gli impianti post-estrattivi e gli impianti inseriti in osso rigenerato. Il campione di 80 pazienti (un impianto per paziente: totale 80 impianti) è stato suddiviso in quattro gruppi: PCP-T = 20 pazienti parodontalmente compromessi trattati, riabilitati con un impianto transmucoso (T) cilindrico (superficie TPS; titanium plasma sprayed); PCP-S = 20 pazienti parodontalmente compromessi trattati, riabilitati con un impianto sommerso (S) cilindrico (superficie machined); PHP-T = 20 pazienti parodontalmente sani, riabilitati con un impianto transmucoso (T) cilindrico (superficie TPS; titanium plasma sprayed); PHP-S = 20 pazienti parodontalmente sani, riabilitati con un impianto sommerso (S) cilindrico (superficie machined).

RACCOLTA ED ANALISI STATISTICA DEI DATI

Le lastrine radiografiche degli ottanta impianti (1 impianto per paziente) sono state scannerizzate con una risoluzione di 1200 dpi ed analizzate utilizzando il programma VixWin Platinum Imaging Software® (Gendex, Des Plaines, IL, USA). La variabile principale BL è stata calcolata come differenza tra il livello osseo marginale ($mBI = \text{marginal bone level}$) al baseline e dopo 10 anni di follow-up ($BL = mBI_{T_0} - mBI_{T_{10}}$). Per evitare errori sistematici, dovuti ad eventuali distorsioni radiografiche, il software è stato calibrato (per ogni singola lastrina radiografica al baseline e dopo 10 anni di follow-up) con la distanza tra due spire dell'impianto. Il BI è stato misurato dalla spalla dell'impianto al margine osseo radiografico. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Sono state calcolate le medie e le deviazioni standard di tutte le variabili. L'impianto è stato considerato come unità statistica. Al baseline l'eterogeneità dei due gruppi rispetto ad età, sesso, FMPS ed FMBS è stata valutata utilizzando il test di Kruskal-Wallis, mentre l'eterogeneità dei siti implantari (mandibola/mascella e anteriore/posteriore) è stata verificata utilizzando una cross tabulation con il coefficiente λ . Un p value < 0.05 è stato considerato come statisticamente significativo. La survival rate (SR) è stata calcolata mediante l'analisi Kaplan-Meier. Sia per la comparazione inter-gruppo delle medie di mBI al baseline ed mBI dopo 10 anni di follow-up, sia per la comparazione del BL tra PCP e PHP è stato effettuato un unpaired t-test ed anche in questo caso un p value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. È stata infine effettuata un'analisi comparativa mediante cross tabulation con il coefficiente λ tra i gruppi, per valutare statisticamente le differenze tra i siti che mostravano una perdita di osso marginale maggiore di 3 mm ($BL > 3$ mm) dopo 10 anni di follow-up.

RISULTATI

Al baseline i due gruppi erano omogenei per età, sesso, FMPS, FMBS e posizione degli impianti (Tabella 1). Dopo 10 anni di follow-up la SR complessiva di tutti gli impianti è stata del 92.5%. Nel gruppo PCP-T è stato perso un impianto dopo 7 anni di follow-up (SR = 95%), mentre nel gruppo PCP-S sono andati perduti 3 impianti rispettivamente dopo 3, 4 e 7 anni di follow-up (SR = 85%). Nei due gruppi PHP è andato perso un impianto per gruppo dopo 5 anni di follow-up (SR = 95% per ciascun gruppo) (Tabella 2). Tra i gruppi PCP e PHP non sono state rilevate differenze statisticamente significative paragonando il mBI al baseline (T_0) degli impianti transmucosi (0.55 ± 0.23 mm e 0.47 ± 0.12 mm; $p = 0.1479$). Un risultato analogo lo si è registrato paragonando al baseline il mBI degli impianti sommersi (1.05 ± 0.19 mm e 1.15 ± 0.12 mm; $p = 0.06$). È stata invece registrata una piccola differenza statisticamente significativa tra gli impianti transmucosi e quelli sommersi all'interno del gruppo PCP (0.55 ± 0.23 mm e 1.05 ± 0.19 mm; $p < 0.0001$) e all'interno del gruppo PHP (0.47 ± 0.12 mm e 1.15 ± 0.12 mm; $p < 0.0001$). Dopo 10 anni di follow-up (T_{10}) nessuna differenza statisticamente significativa è stata registrata, per quanto riguarda il mBI, tra gli impianti transmucosi e quelli sommersi all'interno del gruppo PCP (3.34 ± 0.40 mm e 3.38 ± 0.34 mm; $p = 0.7367$), così come nel gruppo PHP (2.40 ± 0.41 mm e 2.54 ± 0.36 mm; $p = 0.2767$). Tuttavia una differenza statisticamente significativa è stata trovata tra i gruppi PCP e PHP paragonando tra loro le medie del mBI degli impianti transmucosi (3.34 ± 0.40 mm

e 2.40 ± 0.41 mm; $p < 0.0001$) e paragonando tra loro le medie del mBI degli impianti sommersi (3.38 ± 0.41 mm e 2.54 ± 0.36 mm; $p < 0.0001$) (Tabella 3). Nella tabella 4 sono descritti i risultati della comparazione del BL tra gli impianti inseriti nei PCP e nei PHP. Vengono inoltre descritti i risultati della comparazione tra i siti che hanno mostrato un BL > 3 mm nei PCP e nei PHP. Una differenza statisticamente significativa è stata registrata confrontando la media di BL degli impianti transmucosi nei PCP e nei PHP, così come una differenza statisticamente significativa è stata registrata paragonando la media di BL degli impianti sommersi tra i due gruppi di pazienti. La media di BL è stata di 2.78 ± 0.48 mm per gli impianti transmucosi inseriti nei PCP e di 1.95 ± 0.42 mm per gli impianti transmucosi inseriti nei PHP ($p < 0.0001$). Gli impianti sommersi invece hanno mostrato una media di BL pari a 2.32 ± 0.41 mm e 1.43 ± 0.38 mm ($p < 0.0001$) rispettivamente per i PCP ed i PHP. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra le medie di BL degli impianti transmucosi e sommersi nei PCP (2.78 ± 0.48 mm e 2.32 ± 0.41 mm; $p = 0.0046$) e nei PHP (1.95 ± 0.42 mm e 1.43 ± 0.38 mm; $p = 0.0003$). Dopo 10 anni di follow-up, una differenza statisticamente significativa è stata riscontrata paragonando il numero di siti con BL > 3 mm degli impianti transmucosi inseriti nei PCP (13 siti) con gli impianti transmucosi inseriti nei PHP (3 siti) ($p = 0.03$). Anche la comparazione dei siti con BL > 3 mm degli impianti sommersi inseriti nei PCP (9 siti) rispetto al numero di siti con BL > 3 mm degli impianti sommersi inseriti nei PHP (2 siti) ha fatto registrare una differenza statisticamente significativa ($p = 0.18$) (Tabella 4).

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio retrospettivo controllato dimostrano che gli impianti inseriti nei PCP hanno evidenziato un BL maggiore rispetto agli impianti inseriti nei PHP dopo 10 anni di follow-up, indipendentemente dal tipo di impianto utilizzato (sommerso o transmucoso) e dal tipo di superficie (machined o TPS). Questi risultati sono in linea con quelli riportati da Hardt e da Mengel (Hardt et al 2002, Mengel & Floreils-de-Jacoby 2005). Tuttavia questi autori non hanno controllato alcuni fattori di confondimento come le malattie sistemiche (es diabete), il fumo, il tipo di parodontite, il tipo di riabilitazione protesica (corone singole, ponti, cantilever) ed l'inserimento o meno dei pazienti PCP e PHP in un programma di mantenimento. Per evitare questi fattori di confondimento si è disegnato uno studio in cui venissero esclusi tali fattori in modo da avere un campione di pazienti e di impianti assolutamente omogeneo. La presenza di due variabili importanti come la morfologia di due impianti diversi (sommerso e transmucoso) e la differenza di superficie dei due tipi di impianti (machined e TPS) non sono da considerarsi variabili di confondimento, bensì due variabili su cui si è voluto indagare. Infatti, sebbene dall'analisi statistica si sia evidenziato che non ci sono differenze significative per quanto riguarda la morfologia e le superfici degli impianti, tuttavia, nei PCP, dopo 10 anni di follow-up, gli impianti con superficie rugosa (TPS) hanno mostrato un maggior numero di siti con BL > 3 mm (13) rispetto a quelli con superficie liscia (machined) (9). Questo dato è in accordo con i dati pubblicati da Wenströmm che non evidenziano alcuna differenza statisticamente significativa, nei pazienti parodontopatici, tra impianti con superficie machined e con superficie rugosa (Tioblast®) anche se gli impianti machined hanno mostrato una perdita ossea marginale (0.33mm) inferiore agli impianti con

superficie rugosa (0.48mm) (Wennström et al 2004). In conclusione dopo 10 anni di follow-up gli impianti singoli inseriti in pazienti parodontalmente compromessi trattati non fumatori, hanno mostrato una survival rate più bassa e una perdita di osso marginale radiografica più alta degli impianti inseriti nei pazienti parodontalmente sani non fumatori, indipendentemente dalla morfologia e dalla superficie dell'impianto.

Tab. 1 - Caratteristiche della popolazione e posizione degli impianti al baseline

	PCP		PHP		Significance*
	(N=40)		(N=40)		
	T-Implant	S-Implant	T-Implant	S-Implant	
N° of patient	20	20	20	20	-
Mean Age ± SD	47.2±1.4	46.5±1.7	47.5±2.9	48.1±2.1	0.15
Gender	12 (m) 8 (f)	13 (m) 7 (f)	9 (m) 11 (f)	8 (m) 12 (f)	0.34
FMPS ± SD (%)	19.3±2.1	18.4±2.2	18.2±1.8	19.1±2.1	0.22
FMBS ± SD (%)	16.2±2.1	14.4±2.3	15.9±2.3	16.3±1.3	0.26
LOCATION					Coefficiente $\lambda^{\#}$
Mascella Anteriore	7	6	5	3	0.49
Mascella Posteriore	6	5	4	7	
Mandibola Anteriore	3	4	5	4	0.37
Mandibola Posteriore	4	5	6	6	
Coefficiente $\lambda^{\#}$			0.37		

P<0.05 è stato considerato come statisticamente significativo

PCP = Periodontally Compromised Patients; PHP= Periodontally Healthy Patients; T-Implant = Impianti transmucosi; S-Implant = Impianti sommersi; m=maschi; f=femmine; FMPS=Full mouth plaque score; FMBS= Full mouth bleeding score

*Kruskal-Wallis test

#Cross tabulation and lambda coefficient

Tab. 2 - Numero di impianti Persi e Survival Rate (Sr)

	Tipo di Impianto	N° di Impianti	N° di impianti persi (anno di follow-up)	Survival Rate* (%)
	T-Implant	20	1 (7)	95
PCP				
	S-Implant	20	3 (4,5,7)	85
	T-Implant	20	1 (5)	95
PHP				
	S-Implant	20	1 (5)	95
Totale		80	6	92.5

*Kaplan-Meier Analysis

Tab. 3 - Livello di osso radiografico al baseline e dopo 10 anni di follow-up

	PCP (N=40)	PHP (N=40)	P-Value*
mBIT0 (mm)			
T-implant	0.55±0.23	0.47±0.12	0.1479
S-Implant	1.05±0.19	1.15±0.12	0.06
P-Value *	< 0.0001	<0.0001	
mBIT10(mm)			
T-implant	3.34±0.40	2.40±0.41	<0.0001
S-Implant	3.38±0.34	2.54±0.36	<0.0001
P-Value	0.7367	0.2767	

P<0.0001 è stato considerato come statisticamente significativo

mBI₀ = marginal bone level al baseline; mBI₁₀ = marginal bone level dopo 10 anni di follow-up*Unpaired t-test

Tab. 4 - Perdita di osso marginale (bl) e numero di impianti con bl > 3 mm

	PCP (N=40)	PHP (N=40)	P-Value*
BL (mm)			
T-implant	2.78±0.48	1.95±0.42	0.0001
S-Implant	2.32±0.41	1.43±0.38	0.0001
P-Value *	0.0046	<0.0001	
Impianti con			Coefficiente $\lambda^{\#}$
BL > 3 mm			
T-implant	13	3	0.03
S-Implant	9	2	0.18
Coefficiente $\lambda^{\#}$	0.34	0.87	

P<0.0001 è stato considerato come statisticamente significativo *Unpaired t-test

#Cross tabulation and lambda coefficient

BIBLIOGRAFIA

- 1) Heitz-Mayfield L.J. (2008) Peri-implant disease: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology* 35 (Suppl 8): 292-304.
- 2) Hardt C.R.E., Gröndahl K., Lekholm U. & Wennström J.L. (2002) Outcome of implant therapy in relation to experienced loss of periodontal bone support. A retrospective 5-year study. *Clinical Oral Implant Research* 13: 488-494.
- 3) Jung R.E., Pjetursson B.E., Glauser R., Zembic A., Zwahlen M. & Lang N.P. (2008) A systematic review of 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clinical Oral Implants Research* 19:119-130.
- 4) Karoussis I.K., Salvi G.E., Heitz-Mayfield L.J., Brägger U., Hämmerle C.H. & Lang N.P. (2003) Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of ITI Dental Implant System. *Clinical Oral Implant Research* 14: 329-339.
- 5) Lindhe J. & Meyle J (2008) Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 35 (Suppl 8): 282-285.
- 6) Mengel R. & Flores de Jacoby L. (2005) Implants in patients treated for generalized aggressive and chronic periodontitis: a 3-year prospective longitudinal study. *Journal of Periodontology* 76: 534-543.
- 7) Mengel R., Behle M. & Flores de Jacoby L. (2007) Osseointegrated implants in subjects treated for generalized aggressive periodontitis: 10 year results of a prospective long-term cohort study. *Journal of Periodontology* 78: 2229-2237.
- 8) Ong C.T.T., Ivanoski S., Needleman I.G., Retzepi M., Moles D.R., Tonetti M.S. & Donos N. (2008) Systematic review of implant outcomes in treated periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 438-462.
- 9) Renvert S. & Persson G.R. (2002) Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis. *Journal of Clinical Periodontology* 36 (Suppl 10): 9-14.
- 10) Wennström J.L., Ekestubbe A., Gröndahl K., Karlsson S. & Lindhe J. (2004) Oral rehabilitation with implant-supported fixed partial dentures in periodontitis-susceptible subjects. A 5-year prospective study. *Journal of Clinical Periodontology* 31: 713-724.



SIP
Società Italiana
di Parodontologia



DEPOSIZIONE DI MATRICE OSSEA UMANA IN VITRO DA CELLULE ISOLATE DALLA MEMBRANA DI SCHNEIDER

A. Graziano¹, L. Benedetti L.², G. Massei G.³, M. Aimetti¹

¹ Reparto di Parodontologia, Dental School, Università di Torino

² Sezione di Anatomia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Pavia

³ Libero Professionista, Torino

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2010

RIASSUNTO

La membrana di Schneider è la mucosa che riveste la porzione interna delle cavità sinusali mascellari. Sebbene sia nota la capacità della membrana di ripararsi spontaneamente dopo un insulto, non è nota l'eventuale capacità di rigenerare tessuto osseo. Obiettivo del nostro studio è stato l'isolamento e la caratterizzazione di progenitori mesenchimali presenti all'interno della membrana Schneideriana e la valutazione della loro capacità differenziativa in senso osteoblastico.

INTRODUZIONE

La membrana di Schneider è la mucosa che riveste la porzione interna delle cavità sinusali mascellari. La superficie libera è formata da un epitelio di tipo psuedostratificato ciliato mentre la porzione basale è costituita da un connettivo lasso molto vascolarizzato. Sebbene sia nota la capacità della membrana di ripararsi spontaneamente dopo un insulto (Caylakli et al., 2006), non è nota l'eventuale capacità di rigenerare tessuto osseo. Nel 2004 Gruber identificò alcuni progenitori stromali all'interno di mucosa porcina con attività di sintesi per la fosfatasi alcalina, enzima responsabile nel tessuto osseo della calcificazione della matrice extracellulare. Nel 2009 il gruppo di Sroujii dimostrò come cellule estratte da mucosa sinusale umana, in coltura con sostanze osteoinducenti e sedimentate con materiali osteoconduttivi in grado di sostenerne lo sviluppo e il differenziamento, potevano differenziare in osteoblasti in grado di formare matrice ossea in modelli animali sperimentali. La composizione di questa matrice è regolata dall'intera-

zione di due citotipi, gli osteoblasti e gli osteoclasti, le cui proporzioni numeriche sono regolate da processi di proliferazione e inibizione reciproca. Queste due cellule, sebbene profondamente legate, provengono da progenitori differenti. Gli osteoclasti derivano dalla linea ematico monocitaria marcata dalla proteina CD14, mentre gli osteoblasti provengono da precursori mesenchimali residenti all'interno delle guaine vasali di determinati distretti come il midollo osseo e il periostio. Questi ultimi, all'inizio esprimono proteine di membrana come c-kit e CD90; attraverso l'attivazione di alcuni geni chiave, tra cui Runx2, differenziano in maniera irreversibile fino a esprimere proteine e funzioni di un osteoblasta maturo, quali l'osteocalcina (OC), la fosfatasi alcalina (ALP) l'osteopontina (OPN) e la bone sialo protein (BSP) (Valverde 2008). Obiettivo del nostro studio è stato l'isolamento e la caratterizzazione di eventuali progenitori mesenchimali presenti all'interno dello stroma della membrana Schneideriana e la valutazione della loro spontanea capacità di differenziamento in senso osteoblastico, in assenza di fattori osteoinducibili e biomateriali osteoconduttivi di supporto.

MATERIALI E METODI

Selezione dei pazienti

Sei campioni di membrana di Schneider sono stati prelevati durante altrettanti interventi di rialzo del seno mascellare in cui si era verificata la perforazione accidentale della stessa. I pazienti, appartenenti a entrambi i sessi, non presentavano controindicazioni sistemiche e locali all'intervento. Come controllo cellulare sono stati prelevati dagli stessi pazienti 6 campioni di periostio alveolare. Tutti i campioni, dopo il prelievo, sono stati lavati e mantenuti in soluzione fisiologica refrigerata (+4°C). La processazione avveniva entro le ventiquattro ore.

Processazione tessutale

I tessuti sono stati immersi in una soluzione digestiva di collagenasi 3mg/ml e dispasi 4 mg/ml per un'ora a 37°C. La soluzione è stata filtrata su un filtro da 70 micron (Falcon Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La sospensione cellulare è stata centrifugata; il pellet recuperato è stato messo in coltura in α -MEM medium supplementato con 20% FCS, 100 mM 2-P-ascorbic acid, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen, Italy) in 2 flask da 25 ml. Le flask sono state incubate a 37°C a 5% di CO₂ e il mezzo cambiato 2 volte la settimana. Le cellule sono state mantenute in coltura con lo stesso mezzo per l'intera durata dell'esperimento.

Citofluorimetria attivata dalla fluorescenza - FAC

Dopo almeno 5 passaggi le cellule sono state analizzate per la presenza dei seguenti antigeni di superficie mesenchimali: CD34, CD45, CD14, CD117, CD90, CD31 (BD Bioscience), CD44, CD105 (AbD Serotec) e CD133 (Miltenyi Biotec). Le cellule sono state staccate con PBS con lo 0,5% BSA, incubate con l'anticorpo in diluizione 1:10 nello stesso buffer per 30' al buio. Dopo due lavaggi con PBS 0,5% BSA le cellule sono state analizzate con citofluorimetria FAC (Calibur Becton&Dickinson).

Osteogenicità delle cellule di membrana e di periostio

Negli esperimenti a lungo termine, per verificare l'effettiva osteogenicità, dopo 2 settimane di coltura le cellule sono state poste in α -MEM contenente il 10% FCS, 100mM 2-P-ascorbic acid, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and b-glycerophosphate (Sigma) ad una concentrazione finale di 3,5 mM. Le colture sono state fermate a 15, 30, 38 giorni per l'analisi.

Colorazione con Alizarin Red

Le cellule sono state piastrate a 5.000 cellule/cm². Dopo 30 e 38 giorni di coltura in mezzo di mantenimento le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS. I depositi di calcio sono stati colorati con rosso di alizarina (40 mM 10min a RT e in lieve agitazione). Successivamente il colorante è stato solubilizzato in 10% Cetylpyridinium in 10mM phosphate buffer e la concentrazione di ciascun campione è stata valutata allo spettrofotometro a 562 nm come descritto da Stanford e collaboratori.

Valutazione PCR e qPCR di espressione genica

L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita coltivando le cellule in mezzo nutritivo (fbs al 20%) per 15 giorni e in mezzo standard (fbs al 10%) per altri 22 giorni. I punti di analisi sono stati a 0, 15 e 38 giorni. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule usando RNeasy Mini Kit (Qiagen) e digerito con RNase-free DNase (Qiagen) per rimuovere ogni contaminazione di DNA. La sintesi del cDNA dall'RNA totale con iScriptTM cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). L'amplificazione della PCR amplification è stata effettuata in 25 μ l che contengono 2 μ l di cDNA, 2 mM di MgCl₂, 0,2 mM di dNTP's, 0,025U/ μ l di Taq DNA polymerase (Platinum Taq Invirogen). L'amplificazione dei prodotti è stata visualizzata su gel di agarosio dopo colorazione con ethidio bromuro. Per successive analisi è stata utilizzata una RT-PCR quantitativa usando una Mini-Opticon® Real-Time PCR System e relativo software (BioRad), ogni campione è stato analizzato in triplicato in un volume totale di 20 ml di soluzione contenente 20 μ l amplification mixture containing 2x (10 μ l) Brilliant® SYBR® Green PCR Master Mix (Stratagene), 2 μ l of cDNA, 0,4 μ l of each primer, 7,2 μ l of H₂O.

RISULTATI

La membrana esprime sin dal giorno 0 trascritti per antigeni precoci di differenziamento osseo, come Runx-2. Accanto a questi troviamo trascritti di antigeni più tardivi come osteocalcina e osteopontina, oltre a marker generici di differenziamento mesenchimale quali collagene tipo I e CD90. Negativa in tutti i cloni la banda relativa a BOSP (Fig. 1). L'analisi del trascritto a 14 gg ha confermato l'espressione di OC e OP, con maggiore omogeneità e intensità rispetto al giorno 0, dato che viene confermato al giorno 38, sebbene con una lieve depressione dell'intensità di banda per OP. Negativa in tutti i cloni la banda relativa a BOSP anche ai giorni 14 e 38 (Fig. 2). L'analisi della presenza di HA effettuata mediante colorazione con Alizarin Red ha confermato la presenza di HA già al giorno 14 per tutti i 6 cloni, quantità che mediamente aumenta al giorno 38, con la sola eccezione del clone SB in cui non è stato possibile ripetere l'analisi per precoce

senescenza della coltura e conseguente apoptosi (Fig. 3). L'analisi FAC effettuata al giorno 20 ha confermato la presenza di popolazioni mesenchimali eterogenee dal punto di vista differenziativo in senso osteogenico, con presenza di una subpopolazione che esprime, sebbene in percentuali basse (3,83%), antigeni di staminalità quali c-kit. La quasi totalità delle cellule esprime CD44 e conferma la presenza dell'antigene CD90, entrambi marker mesenchimali e CD105, marker vascolare. Negativi invece i marker di staminalità CD34 e CD133. Negativi per questo tipo di cellule stromali HLA II e il CD14 e il CD45 e il CD31 (Fig. 4). Il periostio all'analisi FAC ricalca il pattern espresso dalle cellule della mucosa sinusale, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, con 3 cloni che esprimono antigeni di staminalità c-kit, sebbene in percentuale media leggermente minore (3,05%). L'analisi del trascritto al giorno 0 evidenzia per il clone GB una marcata positività sia dei marker precoci che tardivi di differenziamento osteogenico, quali Runx-2, OC e BOSP. Quest'ultima che invece risulta negativa per MB e RT. Tutti i cloni risultano negativi per OP. L'analisi del trascritto a 14 gg conferma l'analisi del giorno 0 e trova positiva la banda relativa a BOSP anche per i cloni MB e RT; l'analisi al giorno 38 conferma le positività del giorno 14 ad eccezione della banda della BOSP che scompare nel clone RT. Il dato è stato confermato da analisi Real Time PCR. La banda relativa alla OP permane negativa invece in tutti i cloni sia a 14 che 38 gg. Il contenuto di HA, già presente nei cloni al giorno 14, risulta incrementato al giorno 38 all'analisi Alizarin Red.

DISCUSSIONE

Obiettivo del lavoro è stato la valutazione delle capacità osteogeniche intrinseche alla membrana di Schneider. Sebbene sia stata dimostrata l'ossificazione all'interno della cavità sinusale del seno dopo semplice elevazione della membrana, i meccanismi cellulari e molecolari che sovrintendono a questi meccanismi non sono chiari (Palma 2006). L'identificazione di progenitori ALP positivi e di cellule che sotto stimolazione possono andare incontro a differenziamento osteogenico indirizza la ricerca verso l'identificazione di popolazioni cellulari sito specifiche in grado di dare luogo ad osteogenesi. In questo lavoro sono stati identificati progenitori estremamente indifferenziati, cellule che esprimono c-kit, il recettore per lo stem cell factor. È stata inoltre dimostrata la possibilità per questa popolazione di cellule indifferenziate di andare incontro a un self-commitment, auto programmazione in senso osteogenico, in coltura di mantenimento standard in piastra, senza induzione chimica fisica o meccanica. Ciò proverebbe che all'interno della membrana esistono dei progenitori "programmati" per strutturare la popolazione cellulare e dare origine a centri di nucleazione in cui depositare HA. L'origine di questi progenitori sembrerebbe da ricercare nelle guaine perivasali, come evidenziato dalla marcata positività al CD105, marker dell'endogliina, proteina presente in cellule di derivazione vasale. Nel nostro studio abbiamo preferito evitare l'utilizzo dell'antigene STRO-1 precedentemente utilizzato in quanto ridimensionato ultimamente il suo ruolo nell'osteogenesi propriamente detta. Il fatto che al giorno 20, quando all'interno della popolazione totale sono già ben presenti i marker di differenziamento osseo, vi sia ancora una subpopolazione, sebbene esigua, che esprime marker di staminalità, testimonia un'alta capacità rigenerativa delle cellule da membrana, superiore allo stesso periostio come risulta dalle percentuali più alte di cellule c-kit+ a 20 gg (3,83 VS 3,05). La negatività al

CD34 e al CD133 invece ci elimina la possibilità di una pluripotenzialità staminale e restringe il campo all'ambito rigenerativo mesenchimale, confermato dalla positività altissima al CD44 e al CD90. Come dimostrato queste cellule sono in grado di andare incontro ad un differenziamento osteoblastico, come risulta dai trascritti mRNA a 38gg e dalla sostanziale sovrapposizione dei risultati con quelli risultanti dal periostio. Di particolare interesse, sebbene necessiti di maggiori approfondimenti, è l'espressione differenziale nei due siti di OP e BOSP, la prima presente nella membrana ma non nel periostio, con pattern opposto la seconda. Queste due proteine sono marker dei diversi stadi maturativi che un progenitore mesenchimale attraversa prima del differenziamento osteoblastico. L'assenza sembra indirizzare verso una diversità architettonale dell'osteogenesi da membrana sinusale e periostio, con un'ossificazione prevalentemente intramembranosa nella prima e con una prevalenza di neoapposizione a una matrice preesistente nel secondo. In altre parole a livello della membrana sinusale l'ossificazione avverrebbe per mezzo di un'infiltrazione e sostituzione secondo gli schemi Dynamic Bone Formation nella mucosa sinusale e della Static Bone Formation a livello periostale. (Palumbo et al, 2003). L'osteopontina è una proteina chiave per il metabolismo osseo e di altri tessuti; modula l'interazione tra questi e il torrente ematico, mediando l'adesione cellulare, l'angiogenesi e la risposta infiammatoria (Denhardt et al, 2001). L'osteopontina costituisce circa il 2% di tutte le proteine non collageniche dell'osso. Qui le sue funzioni precise non sono ancora state completamente identificate, sebbene ci sia uniformità di pensiero nel suo coinvolgimento, insieme al CD44, nei processi di deposizione di HA e nel rimodellamento osseo, mediando l'equilibrio tra osteoblasti e osteoclasti attraverso meccanismi pro-apoptici mediati dalla concentrazione di calcio (Hu et al.1995). L'apoptosi, che OP indurrebbe attraverso il legame con le integrine di membrane delle cellule bersaglio è ciò che maggiormente regola i meccanismi di neoapposizione nell'osso in via di sviluppo secondo le linee dettate dalla Dynamic Bone Formation (DBF). L'importanza di OP è stata messa in evidenza in topi in cui il gene per OP era stato inattivato dalla nascita: in questi animali si riscontrava il fenomeno dell'osteopetrosi così come di una generale difficoltà alla resistenza alle infezioni e ad un ritardo nei meccanismi cellulari di riparazione delle ferite, compresa la rigenerazione ossea (McKee & Nanci, 1996, O'Regan & Berman, 2000). Da segnalare inoltre il coinvolgimento di OP nella formazione della cosiddetta "linea cementante", la possibilità cioè di un'ossificazione "de novo" su substrati organici o inorganici, fondamentale nei risvolti clinici e di ingegneria tissutale che questi potrebbero avere. Questi dati, se confermati in un campione più ampio, pongono una luce nuova sui meccanismi biologici di sviluppo dello splancnocranio e avrebbe risvolti clinici per la pianificazione razionale di procedure clinico chirurgiche quali quelle del cosiddetto rialzo del seno mascellare. Tecniche chirurgiche rigenerative senza l'ausilio di materiali da innesto potrebbero trovare un loro razionale biologico.

Analisi RT-PCR a 0gg in alcuni cloni di membrana



Fig. 1 - Analisi RT-PCR a oggi in alcuni cloni di membrana

Analisi RT-PCR a 14e 38 gg in alcuni cloni di membrana

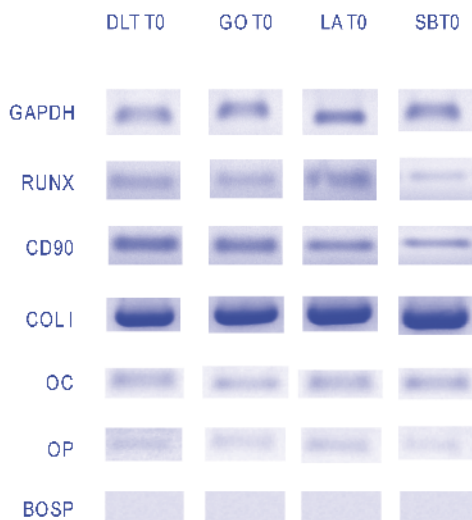


Fig. 2 - Analisi RT-PCR a 14e 38 gg in alcuni cloni di membrana

Contenuto di HA in cellule di membrana

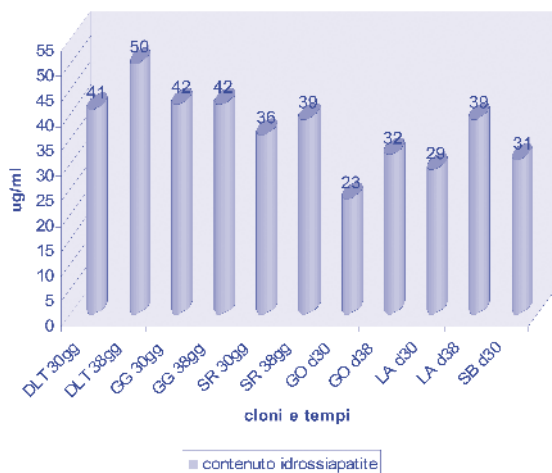


Fig. 3 -Contenuto di HA in cellule di membrana

Cellule di Membrana di Schneider

HLA DR/HLA ABC	-/+
CD34/CD45	-/-
CD14/CD117	-/(3,5%)
CD44/CD133	+(99,4%)-
CD90	+(99%)
CD105/CD31	+(88%)-

Fig. 4 - Cellule di membrana di Schneider

BIBLIOGRAFIA

1. Caylakli F, Yavuz H, Cagici AC, Ozluoglu LN. Endoscopic sinus surgery for maxillary sinus mucoceles. *Head Face Med.* 2006; 2: 29.
2. Gruber R, Kandler B, Fuerst G, Fischer MB, Watzek G. Porcine sinus mucosa holds cells that respond to bone morphogenetic protein (BMP)-6 and BMP-7 with increased osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Oct; 15(5): 575-80.
3. Srouji S, Kizhner T, Ben David D, Riminucci M, Bianco P, Livne E. The Schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: in vivo and in vitro study. *Calcif Tissue Int.* 2009 Feb; 84(2): 138-45.
4. Valverde P, Zhang J, Fix A, Zhu Ji, Ma W, Tu Q, and Chen J. Overexpression of Bone Sialoprotein Leads to an Uncoupling of Bone Formation and Bone Resorption in Mice. *J Bone Miner Res.* 2008 November; 23(11): 1775–1788. Published online 2008 June 30 doi: 10.1359/JBMR.080605.
5. Palma VC, Magro-Filho O, de Oliveria JA, Lundgren S, Salata LA, Sennerby L. Bone reformation and implant integration following maxillary sinus membrane elevation: an experimental study in primates. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2006; 8: 11-24.
6. Palumbo C, Ferretti M, De Pol A. Apoptosis during intramembranous ossification. *J Anat.* 2003 Dec; 203(6): 589-98.
7. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: Regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107: 1055-1061.
8. Hu DD, Hoyer JR, Smith JW. 1995a. Ca2p suppresses cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin alpha v beta 3. *J Biol Chem* 270: 9917-9925.
9. McKee MD, Nanci A, Khan SR. 1995. Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *J Bone Miner Res* 10: 1913-1929.
10. O'Regan A, Berman JS. 2000. Osteopontin: A key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 81: 373-390.

