

## **EFFICACIA CLINICA DEL LEMBO SPOSTATO CORONALMENTE CON O SENZA INNESTO DI TESSUTO CONNETTIVO PER IL TRATTAMENTO DI RECESSIONI MULTIPLE IN AREA ESTETICA. STUDIO CLINICO RANDOMIZZATO CONTROLLATO**

**Lorenzo Landini\*, Sandro Cincinelli\*, Jana Mervelt\*, Michele Nieri\*, Gabriella Pagavino°, Andrea Pilloni\*\* e Francesco Cairo\***

*\*Cattedra di Parodontologia, Università di Firenze*

*°Cattedra di Endodonzia, Università di Firenze*

*\*\*Cattedra di Parodontologia, Università La Sapienza, Roma*

**Conflitto di Interessi:** Gli autori dichiarano assenza di conflitto d'interessi riguardante i contenuti dello studio.

**Parole Chiave:** estetica, copertura radicolare, recessione gengivale, lembo spostato coronalmente, innesto di tessuto connettivo, recessioni gengivali multiple.

**Fonte di finanziamento:** Lo studio è stato autofinanziato dagli autori e dalle loro istituzioni.

### **Riassunto**

**Introduzione:** L'obiettivo di questo studio è verificare l'efficacia clinica del lembo spostato coronalmente a busta (CAF) con o senza l'aggiunta d'innesto di tessuto connettivo (CTG) nel trattamento di recessioni gengivali multiple adiacenti in zona estetica (MAGR). **Materiali e metodi:** Sono stati trattati 32 pazienti per un totale di 74 recessioni gengivali. Le misurazioni sono state realizzate da un esaminatore calibrato in cieco. Le variabili analizzate comprendevano la copertura radicolare completa (CRC), la riduzione della recessione (RecRed), il guadagno di tessuto cheratinizzato (KT), l'incremento dello spessore gengivale (GT) e il Root coverage Esthetic Score (RES). Per valutare la soddisfazione del paziente è stata utilizzata la scala VAS (Scala Visuale Analogica). **Risultati:** Al follow-up a 1 un'interazione fra il tipo di trattamento e lo spessore dei tessuti è stato dimostrato. CAF+CTG ha mostrato migliori risultati in termini di CRC ( $p=0.0016$ ) e RecRed ( $p<0.0001$ ) rispetto al solo CAF nei siti con biotipo gengivale sottile ( $\leq 0.8\text{mm}$ ). CAF era invece associato a una simile efficacia clinica e un miglior risultato estetico che CAF+CTG nei siti con biotipo spesso ( $>0.8\text{mm}$ ). Inoltre, CAF+CTG era associato a un maggiore guadagno di KT ( $p<0.0001$ ) rispetto al solo CAF e maggiore disagio post operatorio. **Conclusioni:** CAF+CTG è più efficace del solo CAF nell'ottenere la copertura radicolare nelle recessioni gengivali con biotipo sottile ( $\leq 0.8\text{mm}$ ) multiple in area estetica. L'aggiunta di un innesto di connettivo va evitata a siti con spessore gengivale  $>0.8\text{ mm}$ , dove il solo CAF si associa a simili risultati clinici e migliori risultati estetici della procedura bilaminare.

### **Rilevanza Clinica**

#### **Razionale per lo studio**

Il trattamento delle recessioni multiple in area estetica è poco studiato in studi randomizzati e non sono chiari i fattori che indicano l'aggiunta di un innesto di connettivo sotto il CAF.

#### **Risultati Principali**

E' stata dimostrata un'interazione fra il tipo di trattamento e lo spessore gengivale a baseline. CAF+CTG è risultato in una maggiore probabilità di CRC ( $p=0.0016$ ) e RecRed ( $p=0.0016$ ) che il solo CAF nei siti con biotipo sottile (spessore  $\leq 0.8\text{ mm}$ ).

#### **Implicazioni Pratiche**

Considerando una recessione media simile, l'aggiunta di CTG sotto il CAF è fortemente per siti con spessore di KT  $\leq 0.8$ . Al contrario l'uso di CTG dovrebbe essere evitato nei siti con KT  $>0.8$ , dove l'uso del solo CAF dà simili risultati clinici e migliori risultati estetici della procedura bilaminare.

### **Introduzione**

Un'evidenza scientifica consistente mostra come più tecniche chirurgiche sono capaci di ottenere la copertura radicolare nella recessione singola (Cairo et al. 2008; Chambrone et al. 2012; Cairo et al. 2014; Chambrone & Tatakis 2015). Tra le differenti procedure di chirurgia plastica parodontale, l'uso di un innesto di tessuto connettivo (CTG) sotto il lembo spostato coronalmente (CAF) è stato associato con la più alta probabilità di ottenere la copertura radicolare completa (CRC) in recessioni con o senza perdita di attacco clinico interprossimale (Cairo et al. 2012; Cairo et al. 2014).

Al contrario, l'evidenza riguardo il trattamento delle recessioni gengivali multiple è limitata (Tonetti et al. 2014). Una recente revisione sistematica (SR) comprendente 9 studi clinici randomizzati controllati (RCTs)

ha riportato una grande eterogeneità in termini di probabilità di ottenere CRC (24-89%) comparando tecniche differenti (Graziani et al. 2014).

## **Materiali e metodi**

### ***Partecipanti***

Il presente articolo è stato redatto in accordo con le linee guida CONSORT per il miglioramento della qualità degli studi clinici randomizzati a gruppi paralleli. Lo studio è stato strutturato come parallelo, randomizzato, con un centro unico riguardante il trattamento delle MAGR. Sono state comparate due differenti modalità di trattamento: il Lembo Spostato Coronalmente (CAF) con Innesto di Tessuto Connettivo (CTG) (gruppo test) e il CAF (gruppo controllo). Nella figura 1 è presentato il diagramma dello studio.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università (Ref. 981/14). E' stato ottenuto un consenso informato da tutti i partecipanti allo studio. Nel rilevare il consenso informato e nel condurre lo studio sono stati rispettati i principi enunciati dalla Dichiarazione di Helsinki sulla sperimentazione su soggetti umani rivisti nel 2000.

Sono stati reclutati nello studio i pazienti che detenevano i seguenti criteri d'inclusione:

Età  $\geq 18$  anni

Nessuna malattia sistemica o gravidanza in corso

Fumo  $\leq 10$  sigarette/die

Indice di Placca (FMPS) e Indice di Sanguinamento (FMBS)  $\leq 15\%$  (misurati su quattro siti per dente).

Presenza di almeno due recessioni gengivali vestibolari classificate come RT1 (Cairo et al. 2011) o Miller classe I e II (Miller 1985) con profondità  $\geq 2$  mm. Sono state incluse solamente le recessioni localizzate nell'area anteriore del mascellare (incisivi centrali e laterali, canini, primi e secondi premolari, primo molare) associate a disagio estetico.

No pregressa chirurgia mucogengivale/parodontale nei siti sperimentali.

### ***Criteri di esclusione:***

Corone protesiche sui denti sperimentali

Recessioni gengivali con quantità minima ( $< 1$  mm) di tessuto cheratinizzato (KT) apicale all'area di recessione.

I denti che presentavano abrasioni della giunzione smalto-cemento (CEJ) e/o scalini sulla radice sono stati trattati con tecniche restaurative prima della chirurgia. I punti anatomici dei denti adiacenti o controlaterali sono stati usati per identificare la CEJ nei siti sperimentali; attenzione è stata prestata in modo da apporre il materiale restaurativo al massimo 1 mm apicale all'ideale livello della CEJ (Cairo & Pini Prato 2010).

Ogni paziente (unità sperimentale) ha contribuito con una singola procedura chirurgica. Quando i pazienti presentavano MAGR bilaterali nell'arcata superiore, il sito sperimentale è stato scelto lanciando una moneta. Quando erano presenti più di 3 recessioni gengivali adiacenti, sono state scelte le più profonde come recessioni sperimentali, mentre le altre sono state trattate con il solo CAF a busta durante la stessa procedura chirurgica.

### ***Interventi/Operatori/Investigatori***

Tutte le procedure chirurgiche sono state realizzate da un operatore esperto (F.C.) con oltre 10 anni di esperienza nel campo della chirurgia plastica parodontale. Due esaminatori, in cieco rispetto alle procedure chirurgiche, hanno valutato tutti i risultati estetici e clinici dei trattamenti.

Il primo esaminatore cieco (SC), valutatore di tutti i risultati clinici, ha seguito una sessione di calibrazione su un totale di 25 pazienti mirata a: (1) istruzione calibrazione nelle tecniche di misurazione; (2) istruzione nella compilazione delle schede di raccolta dati e (3) una sessione di registrazione dati che comprendeva la profondità di tasca (PD), la recessione gengivale (Rec), il livello di attacco clinico (CAL), l'indice di placca (PI) e il sanguinamento sondaggio (BoP).

I dati sulla riproducibilità intra-esaminatore delle misurazioni cliniche si associavano a un coefficiente di correlazione intraclasse di 0.87 (CI 95% 0.82; 0.91) (Cairo et al. 2011). Il secondo esaminatore cieco (A.P.) ha valutato il risultato estetico finale delle procedure chirurgiche usando il Root coverage Esthetic Score (RES) (Cairo et al. 2009; Cairo et al. 2010). L'esaminatore ha seguito un training preliminare sul RES score mediante una serie d'immagini pre e post-trattamento di recessioni gengivali trattate con differenti tecniche chirurgiche.

### ***Raccolta Dati***

La raccolta dei dati ha incluso le misurazioni cliniche al baseline, 1 settimana, 3 mesi, 6 mesi e 1 anno dopo la chirurgia. Sono stati somministrati ai pazienti dei questionari per la valutazione soggettiva del trattamento al baseline, immediatamente dopo la chirurgia, a 1 settimana e a 1 anno di follow-up.

### ***Misurazioni cliniche***

Le seguenti misurazioni sono state ripetute al baseline, 3 mesi, 6 mesi e 1 anno su ogni dente trattato dall'esaminatore in cieco (SC), usando una sonda parodontale PCP UNC 15 (Hu-Friedy):

Rec 0: profondità di recessione al sito centro-vestibolare misurato da CEJ al margine gengivale.

PD 0: Profondità di sondaggio al sito centro-vestibolare.

CAL 0: Livello di attacco clinico come Rec Buc 0+PD Buc 0.

IM-CEJ: Distanza dal margine incisale (IM) alla CEJ.

IM-GM: Distanza dal margine gengivale (GM) al margine incisale (IM).

IM-GMJ: Distanza dal margine incisale (IM) alla giunzione mucogengivale (MGJ).

KT 0: Tessuto cheratinizzato misurato dal punto più apicale del margine gengivale alla MGJ misurato al punto centro-vestibolare.

GT 0: Lo spessore gengivale al baseline misurato 1 mm apicalmente al margine gengivale usando un ago per anestesia e uno stop di silicone sulla superficie gengivale.

Sens: Denti riportanti sensibilità dentale.

Sens Vas: sensibilità dentale testata usando la siringa dell'aria e quantificato dai pazienti mediante scala VAS (Visual Analogue Scale).

Tutte le variazioni nella posizione del margine gengivale sono state monitorate considerando il margine incisale (IM) come punto di repere fisso.

### ***Misurazioni intra-operatorie***

Le seguenti misurazioni sono state rilevate durante le procedure sperimentali su ogni denti coinvolto:

CEJ-BC: distanza tra la giunzione smalto cemento e cresta ossea dopo elevazione del lembo.

IM-GM1: distanza tra il margine incisale e il margine gengivale dopo la sutura

Inoltre, è stato misurato il tempo dell'intervento dalla fine dell'anestesia all'ultima sutura.

### ***Misurazioni cliniche per monitorare la guarigione iniziale***

Le variazioni di Rec, IM-GM, IM-MGJ, KT, sono state raccolte 1 settimana dopo la chirurgia. Sono stati raccolti inoltre dati riguardanti possibili complicanze (edema, necrosi, sanguinamento) discomfort generale e dolore (misurati con Scala Vas-Visual Analogue Scale da 0 a 100) tramite l'esame clinico e il questionario.

### ***Questionario paziente (Baseline, dopo la chirurgia, 1 settimana, 1 anno)***

Al baseline sono state registrate età, sesso, abitudine al fumo, numero di sigarette/giorno e presenza di sensibilità radicolare (VAS da 0 a 100).

Dopo 1 settimana, sono stati registrati i dati riguardo a dolore post operatorio, possibili effetti collaterali o complicazioni. Il discomfort del paziente è stato misurato tramite VAS.

A 1 anno di follow-up, sono stati raccolti i dati relativi alla soddisfazione estetica (VAS) e all'ipersensibilità dentale (VAS). In caso di drop out, veniva annotata la causa. Un operatore differente dal chirurgo e dagli esaminatori clinici si è occupato della gestione di tutti i questionari.

### ***Procedure pre-trattamento***

La terapia causale è stata completata in tutti pazienti prima della chirurgia. In particolare, i pazienti hanno ricevuto istruzioni per l'igiene orale (delicata tecnica rotatoria) con uno spazzolino a setole morbide per eliminare abitudini sbagliate legate all'eziologia della recessione almeno 2 mesi prima della chirurgia.

### ***Procedure di trattamento***

Il lembo a busta con spessore parziale-totale-parziale è stato usato per trattare recessioni multiple (Zucchelli & De Sanctis 2000). In breve, un'incisione intra-sulculare è stata eseguita estendendosi almeno un dente mesiale e almeno un dente distale ai denti con recessione gengivale. Sono state eseguite delle incisioni oblique a livello della papilla interdentale in modo da elevare a spessore parziale ogni papilla chirurgica. È stato quindi realizzato un lembo a tutto spessore fino alla MGJ mediante uno scollaperiostio. Il tessuto molle è stato poi mobilizzato mediante un'incisione orizzontale sopra-periostale apicalmente alla MGJ in modo da eliminare le tensioni muscolari e raggiungere la posizione coronale del GM per ogni dente trattato.

Le superfici radicolari esposte corrispondenti all'area della perdita di attacco clinico sono state attentamente trattate con una delicata levigatura e le papille interdentali anatomiche sono state accuratamente disepitelizzate.

La busta opaca e sigillata per la randomizzazione è stata aperta in questo momento ed è stato comunicato al chirurgo se applicare o meno il CTG sotto al lembo. Nel gruppo test (Fig. 2), un CTG (coinvolgente almeno 2 recessioni adiacenti) è stato prelevato da un lato del palato mediante un approccio a incisione singola (Lorenzana & Allen 2000) o ricavato disepitelizzando un innesto gengivale libero (Zucchelli et al. 2010) secondo disponibilità di tessuto al baseline e numero di denti sperimentali destinati a ricevere l'innesto di

CTG. Lo spessore del CTG misurava approssimativamente 1 mm di spessore mentre l'altezza era simile alle aree di deiscenza.



Fig. 2a



Fig. 2b



Fig. 2c



Fig. 2d

**Immagine 2. Paziente assegnato al gruppo. Fig. 2a:** recessioni gengivali al baseline da incisivi centrali al primo molare. L'abrasione della giunzione smalto-cemento (CEJ) del canino, dei premolari e del primo molare è stata trattata precedentemente con procedure restaurative.

Il canino e il primo premolare sono stati selezionati come denti sperimentali.

**Fig. 2b:** Dopo scollamento del lembo, l'innesto di tessuto connettivo (CTG) è stato suturato sull'area della deiscenza dei denti sperimentali. **Fig. 2c:** sutura del lembo. **Fig. 2d:** Guarigione finale al controllo a 1 anno con copertura radicolare completa di tutti i denti trattati

Il CTG è stato attentamente fissato usando suture riassorbibili (Vycril 7-0, Ethicon, Johnson & Johnson) al periostio apicale o adiacente. Il lembo parziale-totale-parziale è stato quindi passivamente posizionato coronalmente alla CEJ di tutti i denti coinvolti e sono state usate suture sospese con ingaggio della papilla anatomica per stabilizzare il lembo. L'innesto è stato completamente coperto dal margine gengivale in ogni caso. Nel gruppo controllo è stato eseguito il solo CAF (Fig 3).

### ***Istruzioni post-operatorie***

I pazienti sono stati istruiti di evitare ogni trauma meccanico e lo spazzolamento dei denti per due settimane nell'area della chirurgia e applicare una borsa di ghiaccio a intermittenza nell'area operata per le prime 4 ore. I pazienti hanno ricevuto ibuprofene 600 mg alla fine della procedura chirurgica e sono stati istruiti di prendere un'altra compressa sei ore più tardi; sono stati inoltre istruiti nel prendere altri anti-infiammatori in caso di bisogno.

Sono stati prescritti sciacqui con clorexidina due volte al giorno per 1 minuto. È stato ricordato ai fumatori di smettere di fumare per le prime 2 settimane dopo la chirurgia. Sette giorni dopo la chirurgia, le suture sono state rimosse e una profilassi è stata eseguita. Due settimane dopo la chirurgia, I pazienti sono stati istruiti nel riprendere la pulizia dentale meccanica utilizzando uno spazzolino morbido. I pazienti sono stati richiamati a 1, 2, 3, 6, 9 e 12 mesi dopo la chirurgia per procedure d'igiene orale professionale e le misurazioni quando programmate. L'utilizzo di uno spazzolino morbido è stato mantenuto fino al terzo mese di follow-up, quando è stato prescritto uno spazzolino a setole medie.





**Immagine 3. Paziente assegnato al gruppo controllo (CAF). Fig. 3a: recessioni gengivali al baseline da incisivo centrale al primo molare. L'abrasione della giunzione smalto-cemento del primo premolare (CEJ) è stata precedentemente trattata con tecniche restaurative. I premolari sono stati selezionati come denti sperimentali. Fig. 3b: lembo sollevato. Fig. 3c: sutura del lembo. Fig 3d: Guarigione finale al controllo a 1 anno con copertura radicolare completa di tutti i denti trattati**

### ***Calcolo dimensione del campione***

La dimensione del campione stata calcolata usando  $\alpha = 0.05$   $1-\beta$  del 90%. Per la variabilità ( $\sigma = S.D.$ ) è stato usato il valore di 0.383 mm ottenuto da una precedente pubblicazione (Pini Prato et al. 2010) considerando Rec T0 come covariata. Considerando possibili drop-out, il numero dei pazienti alla fine risultata in 16 per gruppo, per un totale di 32 pazienti.

### ***Randomizzazione/Occultamento dell' assegnazione/Mascheramento degli esaminatori***

Ogni soggetto sperimentale è stato assegnato in modo casuale a uno dei due regimi di trattamento. L'assegnazione a un trattamento è stata annotata nel modulo di registrazione e assegnazione del trattamento compilato redatto dallo statistico dello studio (M.N., statistico). L'occultazione dell'assegnazione è stata ottenuta mediante buste opache sigillate, numerate in sequenza. Lo statistico ha generato la sequenza di assegnazione con una lista casuale ottenuta tramite computer e ha istruito i differenti soggetti di assegnare una busta sigillata contenente i trattamenti (CAF+CTG e CAF). La busta opaca è stata aperta dopo l'elevazione del lembo e l'assegnazione del trattamento è stata comunicata all'operatore. Gli operatori sono stati mantenuti in cieco per tutte le procedure sperimentali.

### ***Analisi statistica***

L'analisi statistica è stata ottenuta con JMP 11.0 SAS Institute Inc. Le statistiche descrittive sono state realizzate usando la media  $\pm$  la deviazione standard per le variabili quantitative e le frequenze della percentuale per le variabili qualitative.

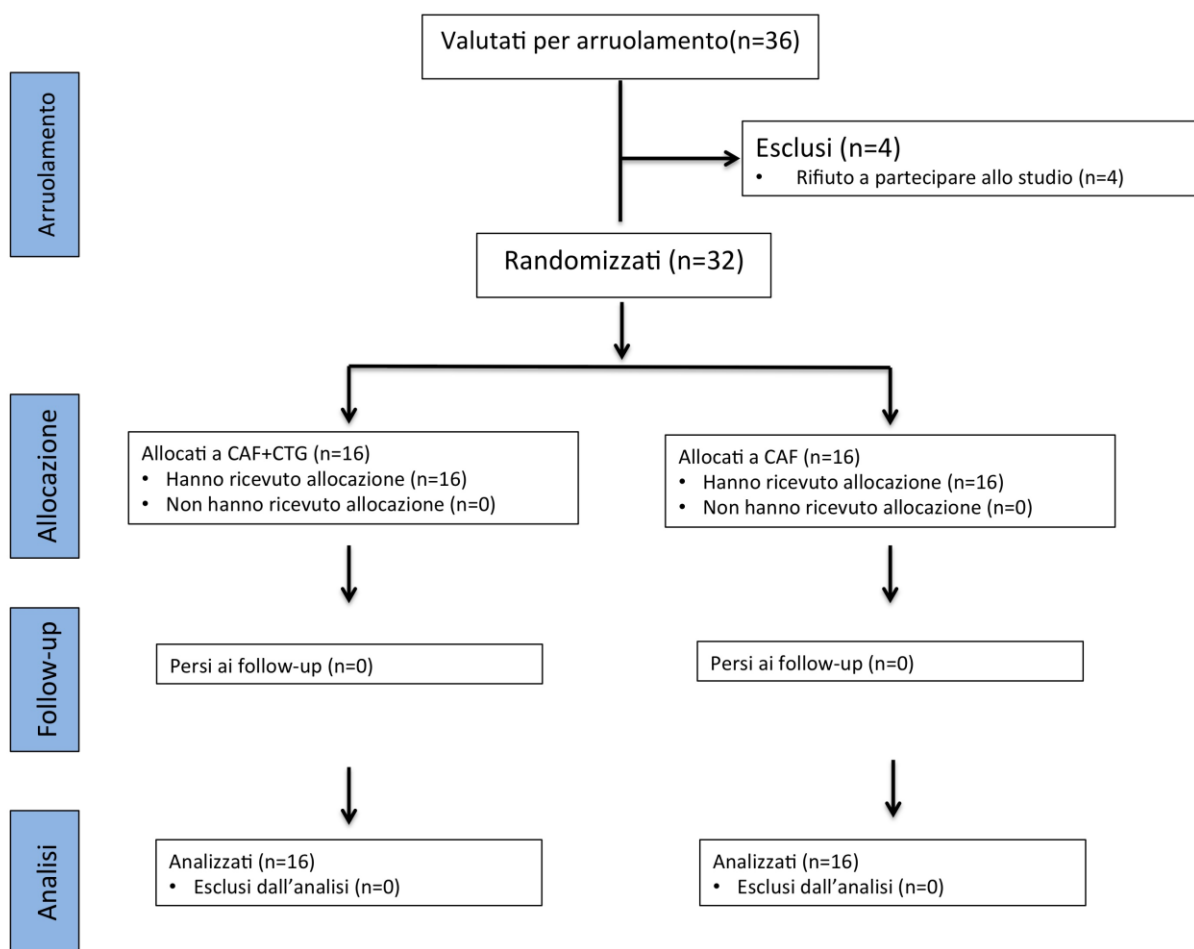
Le variabili primarie sono state il numero dei siti con CRC e la RecRed, misurato come la differenza tra la distanza al baseline tra IM-GM 0 e IM-GM1. Le variabili secondarie includevano i valori RES, KT, tempo della chirurgia, post-operatorio (VAS) e soddisfazione estetica finale (VAS).

Sono stati realizzati modelli multilivello considerando il livello paziente e il livello dente per investigare i fattori influenzanti le variabili ottenute (CRC, RecRed, KT gain). Le variabili esplicative erano il trattamento (CAF+CTG e CAF), la recessione al baseline (Rec 0), lo spessore gengivale al baseline (GT 0), la correlazione tra il trattamento e lo spessore gengivale. La correlazione è stata mantenuta nel modello solo quando era significativa.

## Risultati

### Popolazione sperimentale, pazienti e caratteristiche dei difetti al baseline.

È stato esaminato preliminarmente un campione originale di 36 pazienti che mostravano recessioni gengivali multiple all'arcata superiore e che rispondevano ai criteri d'inclusione; 4 di 36 hanno rifiutato di partecipare alle procedure sperimentali. Infine, un totale di 32 pazienti è stato reclutato e trattato nello studio (vedi diagramma di flusso CONSORT – Fig.1); 16 pazienti sono stati trattati con CAF+CTG (gruppo test) e 16 con CAF solo (gruppo controllo).



### Immagine 1: Diagramma di flusso CONSORT dello studio

Nel gruppo CAF+CTG, 13 su 16 erano donne (81%) e l'età media era  $33.4 \pm 7.0$  anni [Minimo: 26; Massimo: 48]. Due pazienti erano fumatori. Un totale di 36 denti superiori sono stati trattati: quattro incisivi (11%), 8 canini (22%), 22 premolari (61%) e 2 primi molari (6%). La recessione vestibolare al baseline (Rec Buc 0) era  $3.2 \pm 0.8$  mm mentre il corrispondente PD0 era  $1.0 \text{ mm} \pm 0.0$ ; il KT0 era  $2.8 \text{ mm} \pm 0.8$ ; mentre lo spessore gengivale corrispondente era  $0.73 \text{ mm} \pm 0.08$ . Tra i denti trattati, 10 (28%) hanno riportato sensibilità dentale (Sens) corrispondente a  $15.6 \pm 26.7$  dei valori VAS. La distanza media IM-GM dei denti trattati con CAF+CTG era  $13.6 \pm 1.5$ .

Nel gruppo CAF, 10 su 16 erano donne (62%), e l'età media era  $35.1 \pm 10.4$  anni [Minimo: 20; Massimo: 53]. Tre pazienti erano fumatori. Un totale di 38 denti superiori sono stati trattati: 11 incisivi (29%), 11 canini (29%), 15 premolari (39%) e 1 primo molare (1%). La recessione vestibolare al baseline (Rec Buc 0) era  $3.0 \pm 0.9$  mm [2; 5] mentre il corrispondente PD0 era  $1.0 \text{ mm} \pm 0.0$ ; il KT0 era  $3.1 \text{ mm} \pm 1.0$ ; mentre il corrispondente spessore gengivale era  $0.76 \text{ mm} \pm 0.09$ . Tra i denti trattati, 5 (13%) ha riportato sensibilità dentale (Sens) corrispondente a  $5.3 \pm 14.5$  dei valori VAS. La distanza media IM-GM dei denti trattati con CAF era  $13.5 \pm 1.4$ .

**Valutazione della procedura chirurgica e del periodo post-operatorio (1 settimana)**

La durata media della procedura chirurgica per il gruppo test era  $79,4 \pm 5.6$  minuti mentre era  $54.7 \pm 4.2$  minuti per il gruppo controllo, suggerendo che l'impiego di CTG era associato con una durata significativamente più alta ( $p < 0.0001$ ).

A 1 settimana di follow-up, il numero di compresse di antinfiammatorio usate era  $3.1 \pm 0.7$  per il gruppo CAF e  $4.2 \pm 1.2$  per il gruppo CAF+CTG, corrispondenti a una differenza significativa ( $p = 0.0023$ ) di 1.1 compresse di antinfiammatorio. I pazienti assegnati al gruppo test hanno sperimentato un discomfort postoperatorio significativamente più alto ( $p < 0.0001$ ) del gruppo controllo ( $44.0 \pm 9.3$  vs  $28.9 \pm 7.0$  valori VAS).

**Risultati clinici (3,6 e 12 mesi)**

Tutti pazienti hanno rispettato le visite di controllo previste e nessuna complicazione maggiore è stata riportata durante le procedure sperimentali. Non ci sono stati dropout alla visita finale. Al follow-up finale tutti pazienti erano soddisfatti dal risultato estetico ottenuto. I pazienti assegnati al gruppo test hanno mostrato una media finale VAS of  $93.5 \pm 5.9$  mentre i pazienti assegnati al gruppo controllo  $86.6 \pm 13.1$ . La differenza non era significativa (6.9; 95%CI from -0.4 to 14.3;  $P = 0.0633$ ).

Nel follow-up a 3 mesi, il numero di siti con CRC era 34 (89%) nel gruppo CAF e di 30 (83%) nel gruppo CAF+CTG. Il numero di siti con CRC diminuiva a 47% al follow-up a 6 mesi mentre era stabile nel gruppo test. Nessuna differenza in termini di siti con CRC è stata osservata tra il follow-up a 6 e 12 mesi in entrambi i gruppi. I dettagli dei risultati clinici a 6 e 12 mesi sono presentati nella tabella 1.

Variabile	CAF (6 mesi) N=38	CAF+CTG (6 mesi) N=36	CAF (12 mesi) N=38	CAF+CTG (12 mesi) N=36
Rec (mm)	0.6 ( $\pm 0.6$ )	0.2 ( $\pm 0.4$ )	0.6 ( $\pm 0.6$ )	0.2 ( $\pm 0.4$ )
RecRed (mm)	2.4 ( $\pm 0.7$ )	3.0 ( $\pm 0.7$ )	2.4 ( $\pm 0.7$ )	3.0 ( $\pm 0.7$ )
IM-GM (mm)	11.1 ( $\pm 1.0$ )	10.5 ( $\pm 1.1$ )	11.1 ( $\pm 1.0$ )	10.5 ( $\pm 1.1$ )
Diff. IM-GM (mm)	2.4 ( $\pm 0.8$ )	3.1 ( $\pm 0.7$ )	2.4 ( $\pm 0.8$ )	3.1 ( $\pm 0.7$ )
CRC (n/%)	18 (47%)	30 (83%)	18 (47%)	30 (83%)
PD (mm)	1.0 ( $\pm 0.0$ )	1.1 ( $\pm 0.2$ )	1.0 ( $\pm 0.0$ )	1.1 ( $\pm 0.2$ )
CAL (mm)	1.6 ( $\pm 0.6$ )	1.2 ( $\pm 0.4$ )	1.6 ( $\pm 0.6$ )	1.2 ( $\pm 0.4$ )
KT (mm)	2.7 ( $\pm 1.2$ )	4.7 ( $\pm 0.9$ )	2.7 ( $\pm 1.2$ )	4.7 ( $\pm 0.9$ )
KTGain (mm)	-0.4 ( $\pm 0.9$ )	1.8 ( $\pm 0.6$ )	-0.4 ( $\pm 0.9$ )	1.8 ( $\pm 0.6$ )
GT (mm)	0.76 ( $\pm 0.10$ )	1.39 ( $\pm 0.18$ )	0.76 ( $\pm 0.10$ )	1.39 ( $\pm 0.18$ )
GT Gain (mm)	-0.002 ( $\pm 0.05$ )	0.66 ( $\pm 0.17$ )	-0.002 ( $\pm 0.05$ )	0.66 ( $\pm 0.17$ )
Sens (n /%)	3 (8%)	0 (0%)	3 (8%)	0 (0%)
Sens VAS (0-100)	1.4 ( $\pm 5.3$ )	0.0 ( $\pm 0.0$ )	1.4 ( $\pm 5.3$ )	0.0 ( $\pm 0.0$ )
RES (0-10)	7.9 ( $\pm 1.4$ )	7.9 ( $\pm 1.4$ )	7.9 ( $\pm 1.4$ )	7.9 ( $\pm 1.4$ )

**Tabella 1: Risultati clinici a 6 e 12 mesi**

**Legenda:** CAF= Lembo Sposato Coronalmente (Coronally Advanced Flap); CAF+CTG= Lembo Sposato Coronalmente più Innesto di Tessuto Connettivo (Coronally Advanced Flap plus Connective Tissue Graft); Rec Red= Riduzione della Recessione (Recession Reduction); CRC= Copertura Radicolare Completa (Complete Root Coverage); IM-GM= Distanza dal margine gengivale (GM) al margine incisale (IM); CAL = livello di attacco clinico (clinical attachment level); PD = profondità di sondaggio (probing depth); KT = ampiezza del tessuto cheratinizzato (width of keratinized tissue); KT Gain = guadagno in ampiezza di tessuto cheratinizzato (Gain in width of keratinized tissue); GT = Spessore Gengivale (Gingival Thickness); GT Gain= Guadagno di Spessore Gengivale (Gain in Gingival Thickness); Sens= Numero di denti con ipersensibilità; Sens VAS= ipersensibilità dentale misurata con Scala VAS (Visual Analogue Scale); RES= Root coverage Esthetic Score.

Al follow-up finale, CRC ( $p = 0.0016$ ) e RecRed ( $p < 0.0001$ ) erano significativamente maggiori nel gruppo test. Inoltre, l'aggiunta di CTG portava a un maggiore guadagno di KT ( $p < 0.0001$ ) e di spessore gengivale

( $p < 0.0001$ ). Nessuna differenza significativa è stata osservata in termini di RES score finale (tabella 1). Dopo 12 mesi, 69% dei pazienti trattati con CAF+CTG ha mostrato la copertura di tutte le recessioni mentre nel gruppo CAF solo il 25% dei pazienti ha ottenuto il pieno successo clinico. La frequenza di distribuzione dei siti trattati con CAF ha mostrato che 10 (77%) su 13 Rec 0= 2mm hanno ottenuto la CRC (tutte con KT 0= $\geq$  3mm), 8 (53%) su 15 Rec 0= 3mm hanno ottenuto la CRC (tutte con KT 0= $\geq$  3mm), 1 (12%) su 8 Rec 0= 4mm ha ottenuto la CRC (75% dei siti trattati senza CRC aveva KT 0 $\leq$  2mm), e nessuno dei 2 Rec 0= 5mm aveva ottenuto la CRC.

Le analisi multi-livello, considerando il livello paziente e il livello dente, sono state realizzate per esplorare i fattori associati ai risultati. Per il risultato della variabile RecRed, la recessione al baseline ( $p < 0.0001$ ), spessore gengivale ( $p < 0.0001$ ), il trattamento CAF+CTG ( $p < 0.0001$ ) e la relazione tra lo spessore gengivale e trattamento ( $p < 0.0001$ ) erano associati con una maggiore RecRed finale. Per valori di spessore  $\leq 0.85$  mm l'aggiunta di CTG è stata associata con una RecRed finale aumentata, mentre per valori  $> 0.85$  mm l'uso del solo CAF è stato associato con risultati migliori.

Osservazioni simili sono state riportate per l'analisi riguardante la CRC come variabile-risultato (tabella 2).

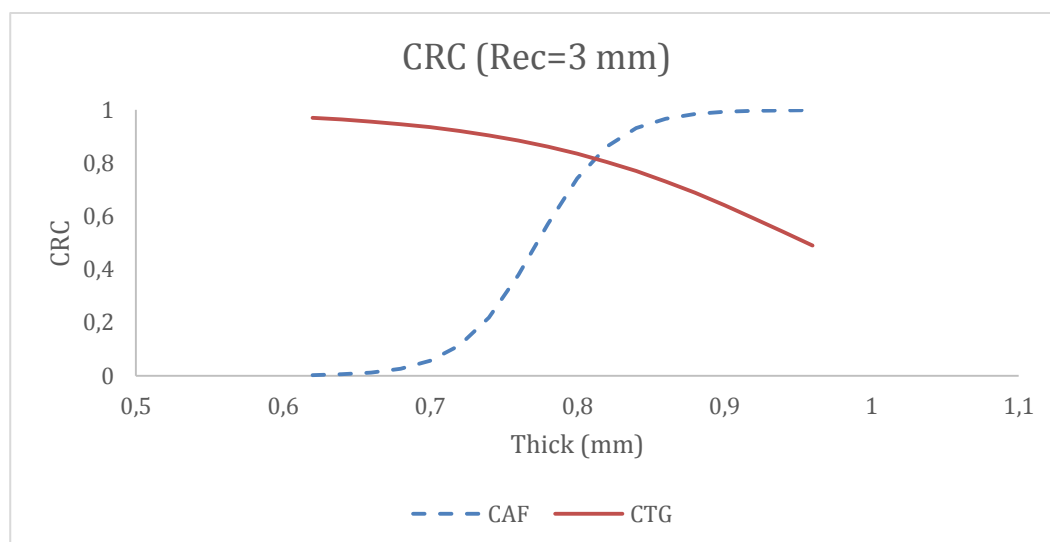
Variabile	Stima	Errore Standard	P-value
Intercetta	-23.962	9.017	
Rec 0	-2.016	0.840	0.0164
GT	38.838	12.553	0.0020
CAF+CTG (vs CAF)	39.974	12.658	0.0016
Interazione (CAF+CTG x GT)	-49.261	16.484	0.0028
$\sigma^2_{\text{Paziente}}$	1.305	1.599	

**Tabella 2: Analisi multilevello (livello paziente e dente) riportante i fattori associati con la Copertura Radicolare Completa (CRC).**

**Legenda:** Rec 0= Recessione al Baseline; GT= Spessore Gengivale; CAF+CTG= Lembo Sposato Coronalmente più Innesto di Tessuto Connettivo; CAF= Lembo Sposato Coronalmente;

Più alta era Rec 0 e minore era la probabilità di ottenere la CRC ( $p = 0.0164$ ). Inoltre, lo spessore gengivale ( $p = 0.0020$ ), il trattamento CAF+CTG ( $p = 0.0016$ ) e la relazione tra lo spessore gengivale e trattamento ( $p = 0.0028$ ) erano associati con un'aumentata probabilità di CRC. Nella figura 4 è visibile un modello esplorativo considerando la relazione tra le procedure chirurgiche e lo spessore gengivale al baseline. Per valori di spessore  $\leq 0.8$ mm l'aggiunta di CTG era associata a una probabilità più alta di CRC, mentre il CTG sembra non essere utile per valori di spessore  $> 0.8$ mm poiché il solo CAF era associato con un'ottimale probabilità di CRC.





**Immagine 4:** Modello esplorativo che considera la relazione tra le procedure chirurgiche e lo spessore gengivale al baseline. Considerando una  $Rec0=3$  al baseline, per valori di spessore gengivale  $\leq 0.8$  mm l'aggiunta di CTG è stata associata a una probabilità più alta di CRC, mentre il CTG non sembra essere utile per valori  $>0.8$  mm in quanto il solo CAF è stato associato a un'alta probabilità di CRC

**Legenda:** CRC= Copertura Radicolare Completa ( $1=100\%$  delle recessioni con CRC); Thick= Spessore Gengivale; CTG= Coronally Advanced Flap plus Connective Tissue Graft; CAF= Lembo Avanzato Coronalmente; Rec= Recessione Gengivale

Un'analisi multilivello per il guadagno di KT (tabella 3) ha mostrato un maggiore guadagno di KT per il gruppo CAF+CTG (differenza media 2.2 mm; 95%CI da 1.8 a 2.7;  $p<0.0001$ ) comparato con il gruppo controllo.

Variabile	Estimate	Std. Error	P-value
Intercept	-0.479	0.823	
KT 0	-0.292	0.126	0.0025
GT	1.286	1.330	0.3336
CAF+CTG (vs CAF)	2.211	0.224	$<0.0001$
$\sigma^2_{\text{Paziente}}$	0.268	0.102	
$\sigma^2_{\text{Dente}}$	0.287	0.063	

**Tabella 3:** Analisi multilevello (livello paziente e dente) riportante i fattori associati con il guadagno di tessuto cheratinizzato (KT gain)

**Legenda:** KT 0= Tessuto Cheratinizzato al Baseline; GT= Spessore Gengivale; CAF+CTG= Lembo Sposato Coronalmente più Innesto di Tessuto Connettivo; CAF= Lembo Sposato Coronalmente

L'interazione fra le procedure chirurgiche e lo spessore iniziale gengivale è stato analizzato anche in funzione dei valori finali di RES. L'aggiunta di CTG era associata con migliori risultati per il biotipo sottile; per uno spessore gengivale  $>0.75$ mm, il CAF da solo era associato ad un migliore valore di RES rispetto a CAF+CTG.

## Discussione

Nella moderna medicina il trattamento di problemi estetici rappresenta una comune richiesta terapeutica. Una recente indagine da parte dell'American Society of Plastic Surgeons ha riportato che il numero totale delle procedure cosmetiche negli Stati Uniti è aumentato del 98% in comparazione con la decade precedente (American Society of Plastic Surgeons 2012). Le recessioni gengivali coinvolgono più del 90% della popolazione (Loe et al. 1992) e rappresentano un comune motivo di trattamento in Chirurgia Plastica Parodontale (PPS) riguardante circa l'8% dei pazienti (Nieri et al. 2013). L'età più giovane, la recessione più profonda e la localizzazione ai denti anteriori erano significativamente associate con la richiesta di trattamento (Nieri et al. 2013). Inoltre, una recente revisione sistematica e meta-analisi bayesiana suggerisce che la PPS è capace di migliorare la soddisfazione estetica del paziente e le procedure di innesto al di sotto del CAF sono associate al più alto risultato estetico per il professionista e per il paziente (Cairo et al. 2016). L'obiettivo di questo studio randomizzato controllato era di testare l'efficacia clinica del CAF con o senza CTG per il trattamento di MAGR in area estetica. Un totale di 32 pazienti con 74 recessioni gengivali su denti superiori (incisivi-canini-premolari-primi molari) sono stati trattati e hanno completato tutte le visite di controllo. Dopo 12 mesi, l'utilizzo di CAF+CTG è associato con una probabilità più alta di CRC finale, RecRed e guadagno di KT rispetto al solo CAF.

La più alta efficacia clinica del CAF+CTG è stata inoltre dimostrata dalla copertura di tutti i difetti di recessione nel 69% dei pazienti in comparazione al 25% dei pazienti che ha mostrato pieno successo clinico un anno dopo il CAF multiplo. E' stato interessante rilevare che l'efficacia del CAF nell'ottenere la CRC era veramente alta per recessioni gengivali iniziali  $\leq 3\text{mm}$ , mentre la probabilità di recessione residua a un anno è realmente alta per le Rec  $0 \geq 4\text{mm}$ .

Una specifica analisi multilivello che ha considerato fattori riguardanti il paziente e al dente è stata applicata ed è stato investigato l'effetto potenziale della relazione tra il trattamento e lo spessore gengivale. Il modello suggerito per lo spessore dei tessuti molli  $\leq 0.8\text{ mm}$  aggiungendo CTG è stato associato con maggiore efficacia in termini di CRC e RecRed, confermando il beneficio della procedura d'innesto nel biotipo sottile (Ahmedbeyli et al. 2014). Al contrario, CAF era similmente efficace di CAF+CTG a siti di spessore maggiore ( $>0.8\text{mm}$ ) confermando il ruolo critico dello spessore gengivale nelle procedure di copertura radicolare (Hwang & Wang 2006). Questi risultati sembrano essere suggerire l'uso di CTG nei recessioni con KT molto sottile solamente.

Un'analisi dettagliata delle posizioni del margine gengivale a differenti intervalli di tempo ha rivelato che il numero di siti con CRC variava molto per il gruppo trattato con CAF tra i controlli a 3 e 6 mesi. Infatti, nel gruppo controllo è stato rilevato un maggior spostamento apicale del margine gengivale con una riduzione da 89% a 47% dei siti con CRC. Al contrario, i siti trattati con CAF+CTG hanno dimostrato una stabilità consistente nello stesso intervallo di tempo, con un numero simile di siti con CRC a entrambi i follow-up a 3 e 6 mesi.

Questi risultati avvalorano l'osservazione che il CTG sotto il lembo agisce come un riempitivo biologico adattando l'interno del lembo alla superficie radicolare. Il CTG può inoltre limitare la contrazione postoperatoria in direzione apicale del CAF favorendo una precoce stabilità del margine gengivale dopo tre mesi come già osservato per il trattamento delle recessioni gengivali singole (Pini Prato et al. 2005, Cortellini et al. 2009, Cairo et al. 2012). Per entrambi i gruppi il numero di siti con CRC è rimasto stabile tra i 6 e i 12 mesi, suggerendo che la guarigione clinica della procedura di copertura radicolare può essere considerata completa dopo sei mesi e ulteriori cambiamenti coinvolgevano solamente la qualità e la tessitura del tessuto molle.

I dati ricavati dal presente studio hanno confermato che l'aggiunta di CTG è associata con un significativo aumento della dimensione apicocoronale del KT dopo 1 anno (differenza media 2.2 mm;  $p < 0.0001$ ). Inoltre, il presente studio ha studiato i possibili cambiamenti nello spessore del KT, suggerendo che un CTG di  $\sim 1\text{mm}$  di spessore è associato a  $\sim 0.7\text{ mm}$  di aumento di spessore gengivale confermando che il CTG sia un approccio predicibile per aumentare il volume di tessuto molle (Zhur et al. 2014).

Può essere ipotizzato che i cambiamenti in spessore/volume del KT possano spiegare, almeno in parte la maggiore stabilità a lungo termine del margine gengivale nei siti trattati con CAF+CTG rispetto al solo CAF tramite il miglioramento delle procedure d'igiene orale domiciliare (Pini Prato et al. 2010; Zucchelli et al. 2014; Cairo et al. 2015).

Il presente studio ha confermato che il CAF+CTG è stato associato con un tempo chirurgico più lungo ( $p < 0.0001$ ) rispetto al solo CAF (Cortellini et al. 2009; Cairo et al. 2012). L'aggiunta del CTG richiedeva approssimativamente 25 minuti addizionali per il prelievo del tessuto molle dal palato e assicurare l'innesto nell'area della deiscenza. Inoltre, i pazienti del gruppo CAF+CTG hanno sperimentato una maggiore morbidità post intervento, un maggiore discomfort post-chirurgico ( $p < 0.0001$ ) e usato 1.1 compresse di

antinfiammatorio in più ( $p=0.0023$ ), probabilmente dovuto alla presenza di una seconda area chirurgica. Al contrario, bisogna ricordare che nessuna complicazione maggiore (sanguinamento, edema persistente, necrosi del lembo etc.) è avvenuta nella prima settimana di follow-up, suggerendo che il trattamento chirurgico delle MAGR è ben tollerato dai pazienti se è applicato un protocollo post-operatorio specifico.

Tutti pazienti trattati erano molto soddisfatti (media VAS>85) in termini di risultato estetico dopo entrambi i trattamenti senza nessuna differenza significativa tra test e controllo. Questo è un risultato veramente importante poiché tutti pazienti erano stati trattati per pura richiesta estetica all'arcata superiore. Inoltre, la valutazione professionale dei risultati estetici non ha mostrato differenze significative tra le due procedure con valore finale RES ~ 8 per entrambi i gruppi. L'analisi multi-livello relativa al RES ha dimostrato come il solo CAF abbia ottenuto migliori risultati estetici a siti con biotipo spesso. Una possibile spiegazione è data dai risultati delle singole variabili del RES, che dimostrano come l'aggiunta di CTG era efficace per ottenere un maggior numero di siti con CRC (variabile primaria del RES), ma i siti trattati con CAF dimostravano un miglior risultato medio per colore, adattamento del contorno marginale e tessitura gengivale (variabili secondarie) rispetto a CAF+CTG. Queste osservazioni suggeriscono cautela nell'applicazione di CTG per spessori >0.8mm, poiché qui l'uso di CAF determina simili risultati clinici e migliori risultati estetici.

Date le limitazioni di questo studio, possono essere tratte le seguenti conclusioni:

CAF+CTG è più efficace rispetto al solo CAF nell'ottenere la copertura radicolare della recessione in recessioni gengivali multiple con biotipo sottile dell'arcata superiore.

L'aggiunta di CTG è anche associata ad una precoce stabilità del margine gengivale a 3 mesi rispetto al solo CAF, che tende a mostrare una tendenza allo spostamento apicale fino al 6 mese, e si associa ad un aumento significativo del KT e dello spessore gengivale.

CAF+CTG è associato con un tempo operatorio più lungo, una maggiore morbidità post-operatoria e maggiore consumo di compresse di antinfiammatorio.

L'interazione fra spessore gengivale e tipo di trattamento ha dimostrato che il solo CAF è associato a simili risultati clinici e migliori risultati estetici che CAF+CTG a siti con biotipo gengivale spesso (>0.8mm).

## Bibliografia

- Ahmedbeyli, C., Ipçi, Ş.D., Cakar, G., Kuru, B.E., Yılmaz, S. (2014) Clinical evaluation of coronally advanced flap with or without acellular dermal matrix graft on complete defect coverage for the treatment of multiple gingival recessions with thin tissue biotype. *Journal of Clinical Periodontology* **41**(3):303-10. doi: 10.1111/jcpe.12211.
- American Society of Plastic Surgeons (2012). Cosmetic Plastic Surgery Statistics. Available at <http://www.plasticsurgery.org/Documents/news-resources/statistics/2012-Plastic-Surgery-Statistics/Cosmetic-Procedure-Trends-2012>
- Cairo, F., Pagliaro, U. & Nieri, M. (2008). Treatment of gingival recession with Coronally Advanced Flap procedures. A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* **35** (Supp 8), 136-162.
- Cairo, F., Rotundo, R., Miller, P.D. & Pini Prato, G.P. (2009) Root coverage esthetic score: a system to evaluate the esthetic outcome of the treatment of gingival recession through evaluation of clinical cases. *Journal of Periodontology* **80**, 705-710
- Cairo, F., Nieri, M., Cattabriga, M., Cortellini, P., De Paoli, S., De Sanctis, M., Fonzar, A., Francetti, L., Merli, M., Rasperini, G., Silvestri, M., Trombelli, L., Zucchelli, G., Pini-Prato, GP. (2010) Root coverage esthetic score after treatment of gingival recession: an interrater agreement multicenter study. *Journal of Periodontology* **81**:1752-1758.
- Cairo, F., Pini-Prato, G.P. (2010) A technique to identify and reconstruct the cemento-enamel junction level using combined periodontal and restorative treatment of gingival recession. A prospective clinical study. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **30**(6):573-81
- Cairo, F., Nieri, M., Cincinelli, S., Mervelt, J., Pagliaro, U. (2011) The interproximal clinical attachment level to classify gingival recessions and predict root coverage outcomes: an explorative and reliability study. *Journal of Clinical Periodontology* **38**(7): 661-666
- Cairo, F., Cortellini, P., Tonetti, M., Nieri, M., Mervelt, J., Cincinelli, S. & Pini-Prato, G. (2012) Coronally advanced flap with and without connective tissue graft for the treatment of single maxillary gingival recession with loss of inter-dental attachment. A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**(8):760-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01903.x
- Cairo, F., Nieri, M. & Pagliaro, U. (2014). Efficacy of periodontal plastic surgery procedures in the treatment of localized facial gingival recessions. A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* **41** (Suppl 15):S44-62. doi: 10.1111/jcpe.12182

- Cairo, F., Cortellini, P., Tonetti, M., Nieri, M., Mervelt, J., Pagavino, G. & Pini-Prato, G. (2015) Stability of root coverage outcomes at single maxillary gingival recession with loss of interdental attachment: 3-year extension results from a randomized, controlled, clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **42**(6): 575-81. doi: 10.1111/jcpe.12412.
- Cairo, F., Pagliaro, U., Buti, J., Graziani, F., Tonelli, P., Pagavino, G. & Tonetti, M. Periodontal Plastic Surgery procedures improve patient aesthetics. A Systematic Review and Bayesian network meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* submitted
- Chambrone L., Pannuti C.M., Tu Y.K, Chambrone L.A. (2012) Evidence-Based Periodontal Plastic Surgery. II. An Individual Data Meta-Analysis for Evaluating Factors in Achieving Complete Root Coverage. *Journal of Periodontology* 2012, 83(4):477-90. doi: 10.1902/jop.2011.110382
- Chambrone, L., Tatakis, D.N. (2015) Periodontal soft tissue root coverage procedures: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *Journal of Periodontology* **86** (2 Suppl):S8-51. doi: 10.1902/jop.2015.130674
- Cortellini, P., Tonetti, M., Baldi, C., Francetti, L., Rasperini, G., Rotundo, R., Nieri, M., Franceschi, D., Labriola, A., Pini-Prato, G.P. (2009) Does placement of a connective tissue graft improve the outcomes of coronally advanced flap for coverage of single gingival recessions in upper anterior teeth? A multi-centre, randomized, double-blind, clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **36**:68-79
- Graziani, F., Gennai, S., Roldan, S., Discepoli, N., Buti, J., Madianos, P & Herrera, D. (2014) Efficacy of periodontal plastic procedures in the treatment of multiple gingival recessions. *Journal of Clinical Periodontology* **41** (Suppl 15):S63-76. doi: 10.1111/jcpe.12172.
- Hwang, D. & Wang, H. L. (2006) Flap thickness as a predictor of root coverage: a systematic review. *Journal of Periodontology* **77**, 1625–1634
- Loe, H., Anerud, A., Boysen, H. (1992). The natural history of periodontal disease in man: prevalence, severity, and extent of gingival recession. *Journal of Periodontology* **63**(6):489-95
- Lorenzana, E. R. & Allen, E. P. (2000) The single-incision palatal harvest technique: a strategy for esthetics and patient comfort. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **20**, 297–305
- Miller, P. D. (1985) A classification of marginal tissue recession. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **5**, 8–13
- Nieri, M., Pini Prato, G.P., Giani, M., Magnani, N., Pagliaro, U., Rotundo, R. (2013). Patient perceptions of buccal gingival recessions and requests for treatment. *Journal of Clinical Periodontology* **40**(7):707-12. doi: 10.1111/jcpe.12114
- Pini Prato, G. P., Baldi, C., Nieri, M., Franceschi, D., Cortellini, P., Clauser, C., Rotundo, R. & Muzzi, L. (2005) Coronal advanced flap: the post-surgical position of the gingival margin is an important factor for achieving complete root coverage. *Journal of Periodontology* **76**, 713–722
- Pini-Prato, G., Cairo, F., Nieri, M., Franceschi, D., Rotundo, R. & Cortellini, P. (2010) Coronal advanced flap versus connective tissue graft in the treatment of multiple gingival recessions: a split-mouth study with a 5-year follow-up. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 644–650
- Tonetti, M.S., Jepsen, S.; Working Group 2 of the European Workshop on Periodontology. (2014) Clinical efficacy of periodontal plastic surgery procedures: consensus report of Group 2 of the 10th European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **41** (Suppl 15):S36-43. doi: 10.1111/jcpe.12219
- Zucchelli, G. & De Sanctis, M. (2000) Treatment of multiple recession-type defects in patients with esthetic demands. *Journal of Periodontology* **71**, 1506–1514
- Zucchelli, G., Mele, M., Stefanini, M., Mazzotti, C., Marzadori, M., de Montebugnoli, L. & De Sanctis, M. (2010) Patient morbidity and root coverage outcome after subepithelial connective tissue and de-epithelialized grafts: a comparative randomized-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 728–738
- Zucchelli, G., Mounssif, I., Mazzotti, C., Stefanini, M., Marzadori, M., Petracci, E., Montebugnoli, L. (2014). Coronal advanced flap with and without connective tissue graft for the treatment of multiple gingival recessions: a comparative short- and long-term controlled randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **41**(4):396-403. doi: 10.1111/jcpe.12224
- Zuh, O., Rebele, S.F., Schneider, D., Jung, R.E., Hürzeler, M.B. (2014) Tunnel technique with connective tissue graft versus coronally advanced flap with enamel matrix derivative for root coverage: a RCT using 3D digital measuring methods. Part I. Clinical and patient-centred outcomes. *Journal of Clinical Periodontology* **41**(6):582-92. doi: 10.1111/jcpe.12178

#### Riferimento

Francesco Cairo, via fra' Giovanni Angelico 51- 50121, Firenze (Italia). E-mail: [cairofrancesco@virgilio.it](mailto:cairofrancesco@virgilio.it)

## **LO STANOZOLOLO CARICATO SU SCAFFOLD DI OSSO BOVINO DEPROTEINIZZATO PROMUOVE LA RIGENERAZIONE OSSEA NEL RATTO**

Ghiacci Giulia, *DDS*

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma*

Graiani Gallia, *BS, PHD*

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma*

Ravanetti Francesca, *MSc, PHD*

*Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università degli Studi di Parma*

Galli Carlo, *DDS, PHD*

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma*

Lumetti Simone, *DDS, PHD*

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma*

Manfredi Edoardo, *DDS, PHD*

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma*

Cacchioli Antonio, *MSc, Prof.*

*Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università degli Studi di Parma*

Sala Roberto, *DM, MSc, Prof.*

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma*

Macaluso Guido Maria, *DM, MSc, Prof.*

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali (S.Bi.Bi.T.), Università degli Studi di Parma*

### **ABSTRACT**

*Questo studio ha valutato gli effetti della somministrazione locale di Stanozololo (ST) sulla rigenerazione ossea nel ratto. Difetti critici bilaterali sono stati creati nella calvaria di 26 ratti Wistar e sono stati riempiti rispettivamente con osso bovino deproteinnizzato+ST (test) o con il solo osso bovino deproteinnizzato (controllo). A 1 e 3 mesi sono stati valutati: osso neoformato (NB), tessuto fibroso (FT), biomateriale residuo (DBBM), tasso di apposizione minerale (MAR). Sono stati inoltre analizzati con immunohistochimica densità capillare, OSX/OC, ALP, COL1A1. L'espressione dei geni GAPDH, RUNX2, COL2A1, SP7, COL2A1, COL1A2, FN è stata valutata tramite RT-PCR. Ad 1 mese, NB è risultato significativamente maggiore nel gruppo test vs controllo ( $24.41\% \pm 4.14\%$  vs  $15.01\% \pm 2.43\%$ ,  $p < 0.05$ ), dato coerente con il MAR ( $9.20\mu\text{m}/\text{day} \pm 0.37\mu\text{m}/\text{day}$  vs  $6.50\mu\text{m}/\text{day} \pm 1.09\mu\text{m}/\text{day}$ ,  $p < 0.05$ ). FT tendeva ad essere maggiore nel gruppo controllo ( $45.53\% \pm 4.95$  vs  $54.21\% \pm 4.83$ ,  $p > 0.05$ ) mentre DBBM risultava simile tra i gruppi ( $29.16\% \pm 4.14\%$  vs  $30.78\% \pm 4.15\%$ ,  $p > 0.05$ ). A 3 mesi, non erano presenti differenze morfometriche tra i gruppi ( $p > 0.05$ ). Le valutazioni immunohistochimiche ed il profilo di espressione genica hanno consentito di confermare gli effetti positivi dello ST sul commitment osteoblastico e sulla deposizione di matrice ossea.*

**Parole chiave:** Ratto; Difetto critico; Innesti ossei; Rigenerazione ossea; Androgeni; Stanozololo

### **Introduzione**

L'atrofia dell'osso alveolare che segue la perdita di uno o più elementi dentali costituisce un comune reperto clinico e può rappresentare un ostacolo ad un'adeguata riabilitazione implantoprotesica. Tra le opzioni per l'aumento del volume osseo, la combinazione di scaffold osteoconduttivi con molecole in grado di promuovere la rigenerazione ossea rappresenta un ambito di crescente interesse scientifico, e diversi fattori (es. fattori di crescita, proteine morfogenetiche) sono stati ad oggi testati.

Gli steroidi androgeni svolgono importanti funzioni nella morfogenesi scheletrica e nel mantenimento dell'omeostasi ossea durante tutto il corso della vita [1][2][3][4]. Diversi esperimenti *in vitro* hanno mostrato



che essi sono in grado di promuovere il differenziamento e l'attività degli osteoblasti e di inibirne l'apoptosi [5][6][7][8][9][10][11]; al contempo, sono stati riportati effetti di inibizione del commitment e dell'azione degli osteoclasti [12][13]. Sperimentazioni su modelli animali hanno mostrato che gli androgeni contribuiscono alla maturazione dei condrociti, all'ossificazione metafisaria e alla crescita delle ossa lunghe [14][15]. La castrazione di ratti e topi è stata associata a riduzione della massa ossea sia corticale sia trabecolare [16][17][18][19][20], che poteva essere prevenuta attuando una terapia ormonale sostitutiva con somministrazione esogena di androgeni [21][22][23][24][25][26][27]. Analoghe evidenze si sono ottenute da sperimentazioni umane ed hanno portato all'uso clinico di steroidi androgeni o derivati per il mantenimento della massa ossea in casi di osteopenia o osteoporosi primaria o da limitata capacità androgenica autogena [28][29][30][31]. Nonostante siano noti gli effetti positivi degli androgeni sul metabolismo osseo, il loro utilizzo a fini rigenerativi è stato finora limitato a causa della scarsa maneggevolezza e dei potenziali effetti collaterali, in primis di virilizzazione e di alterazione del profilo lipidico, legati alla loro somministrazione sistemica. Per supplire a questi inconvenienti, sono stati introdotti steroidi sintetici con elevata azione anabolizzante e minimi effetti androgenici. Tra questi vi è lo Stanozololo (ST), composto non aromatizzabile derivata dal diidrotestosterone, che in sperimentazioni *in vitro* ha mostrato effetti positivi sulla proliferazione osteoblastica [32] e in studi clinici si è mostrato in grado di migliorare i livelli di densità ossea minerale e le proprietà di resistenza biomeccanica dell'osso [33][34].

Oltre al tipo di steroide utilizzato, la sostituzione della somministrazione sistemica con una somministrazione locale potrebbe consentire di ridurre le dosi di impiego e di ottenere un effetto anabolico focalizzato sull'osso, minimizzando gli effetti indesiderati. In un recente studio *in vitro*, l'uso di testosterone combinato a scaffold biodegradabile è stato associato ad un aumento della vitalità e della proliferazione osteoblastica, fornendo risultati incoraggianti per un approccio di somministrazione locale degli androgeni a scopo rigenerativo [35]. Lo ST è stato recentemente testato *in vivo* per via locale nel trattamento di patologie osteoarticolari: periodiche iniezioni intra-capsulari di farmaco hanno avuto effetti positivi sulla rigenerazione cartilaginea, consentendo il ripristino di una corretta anatomia funzionale articolare [36]. Tuttavia, l'applicazione di ST in combinazione a materiale da innesto non è ancora stata testata a livello dell'osso.

Scopo di questo studio è di analizzare gli effetti della somministrazione locale di ST sulla rigenerazione ossea in difetti critici di calvaria di ratto a 1 e a 3 mesi.

## Materiali e Metodi

**Preparazione del biomateriale.** Cinquantadue blocchi di DBBM (Geistlich Bio-Oss® block 1x1x2, Geistlich Biomaterials) sono stati tagliati in dischi di diametro di 5 mm e 1.5 mm di larghezza in condizioni di sterilità, con una fresa a ruota diamantata. I dischi sono stati pesati con una bilancia di precisione (Mettler Toledo Analytical Balance AE240, Marshall Scientific) ed è stato eseguito un matching tra coppie di dischi. Un disco di ciascuna coppia è stato trattato con 150 ml di 0,1% ETOH + 100 nM ST (DBBM + ST, gruppo di test), mentre con 150 ml di 0,1% ETOH (DBBM, gruppo controllo). I dischi sono stati lasciati 20 minuti a temperatura ambiente per consentire l'adsorbimento dello ST, e quindi incubati a 50° C per 4 ore. Ogni disco è stato chiuso singolarmente e contrassegnato da un codice alfanumerico.

**Procedure chirurgiche.** Previa approvazione del Comitato Etico per la sperimentazione animale di Parma, 26 ratti Wistar maschi di 4 mesi sono stati inclusi nello studio. Quindici minuti prima dell'intervento, gli animali hanno ricevuto una somministrazione intramuscolare di 10 mg/kg enrofloxacin (Baytril, Bayer, Germania). L'anestesia è stata ottenuta con l'iniezione intraperitoneale di 30 mg/kg tiletamine cloridrato zolazepam cloridrato (Zoletil 100, Virbac, Francia). La cute della regione parietale del calvaria è stata rasata e disinfettata con iodio-povidone al 10%, poi è stata effettuata una incisione mediana a tutto spessore, estesa sagittalmente dalla linea bipupillare al processo occipitale. I lembi chirurgici sono stati sollevati delicatamente. Difetti critici standardizzati dal diametro di 5,0 mm sono stati creati bilateralmente sull'osso parietale. Il difetto da un lato è stato riempito con DBBM + ST (test) e il controlaterale con DBBM (controllo). Una sutura a due strati (Vycril 5-0, Ethicon, Johnson & Johnson, Netherlands; Prolene 3-0, Ethicon, Johnson & Johnson, Netherlands) è stata effettuata per consentire la guarigione per prima intenzione delle ferite, facendo attenzione a preservare periostio (Figura 1). Tutti gli interventi chirurgici sono stati eseguiti dallo stesso operatore. Dopo l'intervento, i ratti sono stati assegnati in modo casuale a un periodo di guarigione di 1 o 3 mesi. Per valutare il tasso apposizione minerale (MAR), a 23 e 24 giorni i ratti sono stati trattati con 10% Xylenol Orange (Sigma Aldrich, USA) alla dose di 30 mg/kg. Dal giorno 80 al 84, gli animali destinati al periodo di guarigione di 3 mesi sono stati trattati con Calcein Green 20 mg/kg (Sigma Aldrich, USA). Al termine del periodo sperimentale, i ratti sono stati sacrificati con un'iniezione intraperitoneale di pentobarbital 150 mg/kg ed i campioni biologici sono stati prelevati.

Figure 1.



Figura 1. Procedure chirurgiche di innesto: A. scollamento del lebo a tutto spessore lungo la sutura sagittale; B. osteotomia bilaterale dell'osso parietale ottenuta per mezzo di fresa trephine dal diametro esterno di 5 mm; C. aspetto dei difetti critici bilaterali dopo osteotomia; D. difetti innestati con DBBM+ST (lato test) e DBBM (lato controllo). Fotografia ottica (Nikon D3x, 24.5 Megapixels).

**Istomorfometria.** I campioni di 18 ratti sono stati fissati in formalina al 10% per 48 ore, lavati in acqua corrente e decalcificati in acido etilendiamminotetracetico 0.5 M (EDTA) pH 7.4. I campioni sono stati quindi disidratati in una serie ascendente di alcol dal 70% al 100% (Carlo Erba reagents, Italy), chiarificati in xylene (Carlo Erba reagents, Italy) e inclusi in paraffina (Lab-O-Wax, Histoline). Sezioni seriali dello spessore di 5  $\mu$ m sono state ottenute con microtomo rotativo (RM -2155, Leica) in un piano parallelo alla sutura sagittale. Le sezioni centrali sono state colorate con ematossilina-eosina per la valutazione istomorfometrica, mentre sezioni adiacenti sono stati utilizzati per le valutazioni di immunoistochimica. La regione di interesse (ROI) da analizzare è stata determinata identificando i margini laterali del difetto intraosseo e le adiacenti aree periostali superiore ed inferiore. La quantità di formazione di nuovo osso (NB), tessuto fibroso (FT) e biomateriale residuo (DBBM) sono stati calcolati come outcomes primari. Le immagini sono state analizzate grazie ad un microscopio ottico binoculare (Nikon Eclipse 90i, Tokyo, Giappone) collegato a macchina fotografica digitale (DS-5M Nikon, Japan). I dati sono stati analizzati con l'ausilio del software 2.1 NIS-Elements AR (Nikon, Japan).

**Immunoistochimica.** L'analisi immunoistochimica è stata condotta con microscopia ottica e a fluorescenza. Per la valutazione dei capillari, i campioni sono stati incubati con anticorpi anti-von Willebrandt Factor (vWF, policlonale di coniglio, Dako, Danimarca, 1:30), colorati con perossidati coniugata con streptavidina usando DAB come cromogeno, ed infine colorati con ematossilina. Le sezioni sono state esaminate con microscopia ottica a 1000X di ingrandimento con l'ausilio di un reticolo oculare millimetrato. Un totale di 20 campi all'interno di ogni ROI sono stati analizzati per calcolare la il numero di capillari/mm<sup>2</sup> di tessuto.

Gli osteoblasti sono stati valutati con anticorpo anti-Osterix (OSX; policlonale di coniglio, Santa Cruz, USA; 1:50), rivelate da anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con FITC (01:20 60', 37°C, Jackson Laboratories, USA) e colorazione con anticorpo anti-Osteocalcina (OC; policlonale di coniglio, Santa Cruz, USA) rivelata da anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con TRITC (01:20, 60', 37°C, Jackson Laboratories, USA). L'espressione della Fosfatasi Alcalina (ALP) è stata valutata con anticorpo anti-ALP (monoclonale di topo, Santa Cruz, USA) rivelate da anticorpo secondario anti-topo coniugato con FITC (1:20, 60', 37°C, Jackson Laboratories, USA). L'apposizione di Collagene-1 (COL1A1) è stata valutata con anticorpo anti-COL1A1 (policlonale di topo, Santa Cruz, USA) Cruz, USA) rivelato da anticorpo secondario

anti-topo coniugato con FITC (1:20, 60', 37°C, Jackson Laboratories). La colorazione dei nuclei cellulari è stata eseguita con DAPI 5mM (Sigma Aldrich, USA). I vetrini sono stati montati con medium di fluorescenza, Vectashield (VECTOR, USA). Cellule co-positive per OSX/OC ed elementi positivi per ALP e sono stati quantificati a 1000X di ingrandimento con microscopia a fluorescenza ( $n/mm^2$ ). La positività per COL1A1 è stata valutata in fluorescenza con metodica semi-quantitativa, utilizzando il seguente sistema di unità arbitrarie: nessuna espressione visibile (score=0), 1-3 positività/ $mm^2$  (score=1), 4-6 positività/ $mm^2$  (score=2).

*Espressione genica.* I campioni di 6 ratti sono stati raccolti in azoto liquido per analizzare l'espressione dei geni GAPDH, RUNX2, COL2A1, SP7, COL2A1, COL1A2, FN. L'RNA è stato isolato utilizzando il kit TRIzol Reagent (Life Technologies, USA), secondo istruzioni del produttore ed i campioni sono stati quindi retrotrascritti a cDNA (Reverse Transcription System, Promega, USA). Primers specifici sono stati disegnati con il software Primer-Blast (National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA) e sono state eseguite sui campioni RT-PCR (Rotor Gene TM 3000 versione 5.0.06, Corbett Reaserch). In breve, i cDNA sono stati amplificati fino a 40 cicli in un mix composto da 2X Platinum SYBERGreen qPCRsupermix-UDG (Invitrogen, USA), 5 pM primers e acqua RNasi-free. Per ogni gene amplificato è stata verificata la curva di melting e i dati sono stati analizzati con il metodo della curva standard relativa [37]. I dati sono stati normalizzati relativamente al quantitativo di cDNA di ogni campione misurato con Oligreen Assay Kit (OliGreen ssDNA Quantitation Reagent and OliGreen ssDNA Quantitation Kit, Molecular Probes, USA).

*Analisi statistica.* La distribuzione gaussiana dei dati è stata verificata con il test di normalità D'Agostino-Aearson omnibus. L'omogeneità de pesi dei dischi di DBBM e l'efficienza del matching tra campioni del gruppo test e campioni del gruppo controllo è stata valutata con t-test per dati appaiati. Le differenze tra test e controllo per quanto riguarda i parametri morfometrici, immunoistochimici e l'espressione genica sono state valutate con t-test per dati appaiati con correzione di Welch.  $p < 0.05$  è stat considerato come livello di significatività statistica. I risultati sono riportati come media  $\pm$  SEM.

## Risultati

*Preparazione del biomateriale.* Il peso dei dischi di DBBM utilizzati nel gruppo test ( $14.00 \pm 0.64$ ), non è risultato significativamente diverso dal gruppo controllo ( $13.79 \pm 0.59$ ,  $p > 0.05$ ). L'accoppiamento tra i campioni di prova test e controlli ha mostrato di essere efficace ( $p < 0.0001$ ), con coefficiente di correlazione  $r=0.92$ .

*Procedure chirurgiche.* La mortalità intraoperatoria è stata inferiore al 10%. 14 animali sono stati assegnati al periodo di guarigione di 1 mese, e 12 animali a 3 mesi. Dopo l'intervento chirurgico, un ratto è morto per infezione della ferita, mentre tutti gli altri animali hanno mantenuto buone condizioni di salute.

*Istomorfometria.* Gli innesti hanno mostrato una buona integrazione nei tessuti circostanti e non sono stati rilevati segni di reazione immuno-infiammatoria né a 1 mese né a 3 mesi. Nessuno dei difetti ha mostrato una completa guarigione ai tempi sperimentali testati. Tessuti e vasi neoformati sono stati osservati a diretto contatto con la superficie del DBBM innestato, confermando le proprietà di osteoconduttività del biomateriale utilizzato. NB era significativamente maggiore nel gruppo test vs controllo a 1 mese di osservazione ( $24.41\% \pm 4.14\%$  vs  $15.01\% \pm 2.43\%$ ,  $p < 0.05$ ), mentre questa differenza non era più rilevabile a 3 mesi ( $27.36\% \pm 1.76\%$  vs  $27.38\% \pm 2.92\%$ ,  $p > 0.05$ ). FT presentava una tendenza ad essere minore nel test vs controllo, sia a 1 mese ( $45.53\% \pm 4.95$  vs  $54.21\% \pm 4.83$ ,  $p > 0.05$ ) sia a 3 mesi ( $46.19\% \pm 2.99\%$  vs  $47.62\% \pm 3.44\%$ ,  $p > 0.05$ ). Il DBBM residuo è risultato molto simile nel test vs controllo ad 1 mese ( $29.16\% \pm 4.14\%$  vs  $30.78\% \pm 4.15\%$ ,  $p > 0.05$ ) e a 3 mesi ( $24.99\% \pm 2.51\%$  vs  $23.28\% \pm 6.78$ ,  $p > 0.05$ ). Un aumento complessivo di NB è stato osservato nel tempo all'interno del gruppo di controllo, mentre nel gruppo test questo parametro non ha subito variazioni rilevanti nel tempo; ciò indica che nel gruppo controllo la deposizione di osso è proseguita in modo consistente da 1 a 3 mesi, mentre nel gruppo test la porzione principale di osso neoformato a 1 mese era già stato deposto. I risultati sono mostrati nella Figura 2. L'analisi del MAR ha rivelato una consistente attività di rimodellamento osseo ai giorni 23-24, significativamente maggiore nel gruppo test vs controllo ( $9.20 \mu m/day \pm 0.37 \mu m/day$  vs  $6.50 \mu m/day \pm 1.09 \mu m/day$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 3, A-C). A 3 mesi, l'apposizione minerale è risultata molto rallentata e di entità simile tra i gruppi sperimentali ( $7.07 \mu m/day \pm 1.24 \mu m/day$  vs  $7.92 \mu m/day \pm 1.51 \mu m/day$ ,  $p > 0.05$ ) (Figura 3, D-F).

Figure 2.

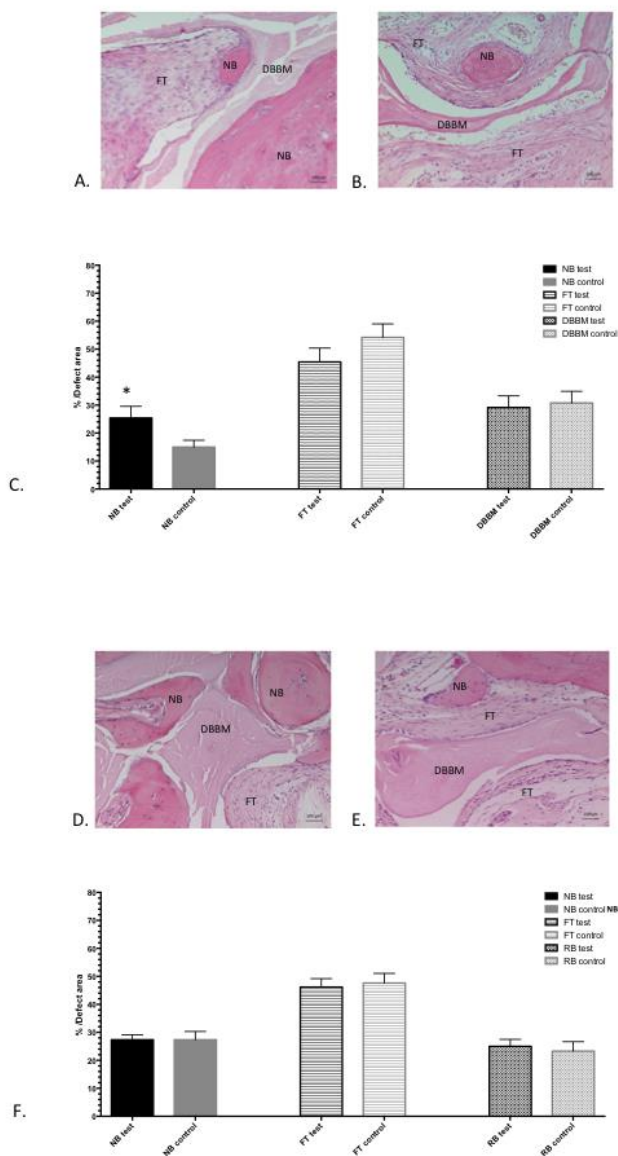


Figura 2. Valutazione istomorfometrica di osso neoformato (NB), tessuto fibroso (FT) e biomateriale residuo (DBBM) in campioni del gruppo test e del gruppo controllo a 1 mese (A-C) e a 3 mesi (D-F). A-B; D-E. Aspetto istologico di un campione del gruppo test (A) e del gruppo controllo (B) a 1 mese; aspetto istologico di un campione del gruppo test (D) e del gruppo controllo a 3 mesi (E). Sono evidenziate con lettere corrispondenti aree di osso neoformato (NB), tessuto fibroso (FT) e biomateriale residuo (DBBM). Colorazione con ematossilina eosina, microscopia ottica, ingrandimento originale 10X, scale bar 100  $\mu$ m. C; F. Tabella che evidenzia i dati morfometrici di osso neoformato (NB), tessuto fibroso (FT) e biomateriale residuo (DBBM) nei campioni del gruppo test e del gruppo controllo a 1 mese (C) e a 3 mesi (F). I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM ed espressi come percentuale rispetto alla ROI analizzata. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ( $p>0.05$ ).

Figure 3.

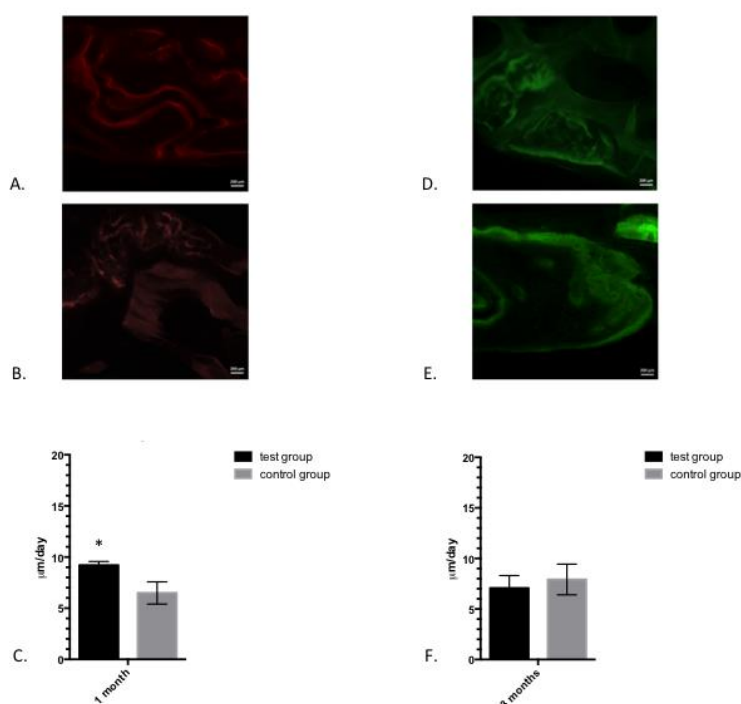


Figura 3. Valutazione del tasso di apposizione minerale (MAR) con le marcature fluorescenti Xylenol Orange (A-C) e Calcein Green (D-F).

A-B. Marcatura con Xylenol Orange che evidenzia consistenti aree di tessuto mineralizzato neoformato ai giorni 23-24 dall'intervento, sia nei campioni del gruppo test (A) sia in quelli del gruppo controllo (B). Microscopia a fluorescenza, ingrandimento originale 4X, scale bar 200 µm.

D-E. Marcatura con Calcein Green che evidenzia ampie zone di mineralizzazione ai giorni 80-84 dall'intervento compatibili con un rimodellamento osseo in corso sia nei campioni del gruppo test (D) sia in quelli del gruppo controllo (E). Microscopia a fluorescenza, ingrandimento originale 4X, scale bar 200 µm.

C; F. Tabella che riporta i valori del MAR in campioni del gruppo test e del gruppo controllo marcati con Xylenol Orange (C) e con Calcein Green (F). I dati sono riportati come media ± SEM. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl (p>0.05).

**Immunohistochemical.** La densità di capillari sanguigni del gruppo test non differiva dai controlli a 1 mese ( $11.43 \text{ n/mm}^2 \pm 2.01 \text{ n/mm}^2$  vs  $11.25 \text{ n/mm}^2 \pm 2.30 \text{ n/mm}^2$ ,  $p>0.05$ ), mentre a 3 mesi i campioni del gruppo test apparivano significativamente più vascolarizzati rispetto ai controlli ( $28.26 \text{ n/mm}^2 \pm 5.62 \text{ n/mm}^2$  vs  $9.84 \text{ n/mm}^2 \pm 2.01 \text{ n/mm}^2$ ,  $p<0.05$ ) (Figura 4). Elementi con co-positività per OSX/OC sono stati riscontrati in numero significativamente minore nel gruppo test vs controllo a 1 mese ( $2.00 \text{ n/mm}^2 \pm 0.21 \text{ n/mm}^2$  vs  $3.9 \text{ n/mm}^2 \pm 0.32 \text{ n/mm}^2$ ,  $p<0.05$ ), mentre un trend opposto è stato rilevato a 3 mesi ( $2.05 \text{ n/mm}^2 \pm 0.27 \text{ n/mm}^2$  vs  $1.01 \text{ n/mm}^2 \pm 0.20 \text{ n/mm}^2$ ,  $p<0.005$ ), dato principalmente legato ad una diminuzione delle positività nel gruppo controllo (Figura 5, A-B). Allo stesso modo, si è riscontrata una tendenza di ALP ad essere maggiormente espresso nel gruppo controllo a 1 mese ( $8.83 \text{ n/mm}^2 \pm 3.80 \text{ n/mm}^2$  vs  $12.14 \text{ n/mm}^2 \pm 6.29 \text{ n/mm}^2$ ,  $p>0.05$ ), mentre un trend opposto si è evidenziato a 3 mesi ( $7.62 \text{ n/mm}^2 \pm 3.19 \text{ n/mm}^2$  vs  $6.29 \text{ n/mm}^2 \pm 2.73 \text{ n/mm}^2$ ,  $p>0.05$ ) (Figura 5, C-D). L'analisi semi-quantitativa di COL1A1 ha rilevato maggiori positività nel gruppo controllo rispetto al test, ad entrambi i time-points (Figura 5, E-F).

**Espressione genica.** L'analisi dell'espressione genica ha permesso di rilevare variazioni di geni correlati al metabolismo cellulare, al differenziamento osteogenico e all'attività di deposizione di matrice osteoide e connettivale. L'espressione di GAPDH, un enzima importante per il metabolismo energetico e la produzione di ATP e piruvato, è risultata significativamente maggiore nel test vs controllo a 1 mese (fold change test/control:  $5.86 \pm 3.52$ ,  $p<0.05$ ), mentre a 3 mesi non erano più riscontrabili differenze (fold change



test/control:  $1.143 \pm 0.62$ ,  $p > 0.05$ ). Tale risultato può indicare un aumento del metabolismo cellulare ascrivibile all'effetto anabolico dello ST, evidente a 1 mese di osservazione, che scompare al time-point più prolungato. L'espressione significativamente maggiore osservata di RUNX2 nel gruppo test vs controllo a 1 mese (fold change test/control:  $4.78 \pm 2.36$ ,  $p < 0.05$ ) depone per un commitment osteoblastico delle cellule, dato che questo gene è un fattore trascrizionale essenziale per il differenziamento a partire fine dalle prime fasi di commitment. Come per la GAPDH, a 3 mesi queste differenze di RUNX tra gruppo test e controllo non erano più osservabili (fold change test/control:  $0.81 \pm 0.36$ ,  $p > 0.05$ ). Il pattern di espressione di SP7, un fattore trascrizionale osteo-specifico che collabora con RUNX2 al differenziamento osseo, era coerente con quella di RUNX2, con valori più alti riportati per i campioni test vs controlli a 1 mese (fold change test/control:  $4.20 \pm 3.23$ ,  $p > 0.05$ ) e nessuna differenza tra i gruppi a 3 mesi (fold change test/control:  $0.68 \pm 0.29$ ,  $p > 0.05$ ). E' stato interessante notare che l'espressione di COL2A1, un gene che codifica per un collagene tipico della cartilagine, era significativamente maggiore nel gruppo test vs controllo 1 mese (fold change test/control:  $5.52 \pm 2.49$ ,  $p < 0.05$ ): questa osservazione potrebbe indicare l'induzione di un'ossificazione di tipo encondrale nel gruppo test, sebbene istologicamente non si sia riscontrata la presenza di tessuto cartilagineo. A 3 mesi, le differenze nell'espressione di COL2A1 tra gruppi sperimentali non erano più rilevabili, outcome ascrivibile a una sostanziale riduzione dell'espressione di questo gene nei campioni del gruppo test (fold change test/control:  $0.75 \pm 0.27$ ,  $p > 0.05$ ). I geni correlati all'apposizione di matrice fibrosa COL1A2 e FN si sono rivelati più espressi nel gruppo controllo vs test a 1 mese (COL1A2 fold change test/control:  $0.01 \pm 0.002$ ,  $p < 0.05$ ; FN fold change test/control:  $0.43 \pm 0.64$ ,  $p > 0.05$ ), mentre a 3 mesi, differenze di espressione tra gruppi non erano più osservabili (COL1A2 fold change test/control:  $1.52 \pm 1.29$ ,  $p > 0.05$ ; FN fold change test/control:  $0.64 \pm 0.55$ ,  $p > 0.05$ ), come è compatibile come una fase di guarigione più avanzata e stabilizzata. I dati di espressione genica sono riassunti nella Figura 6.

Figure 4.

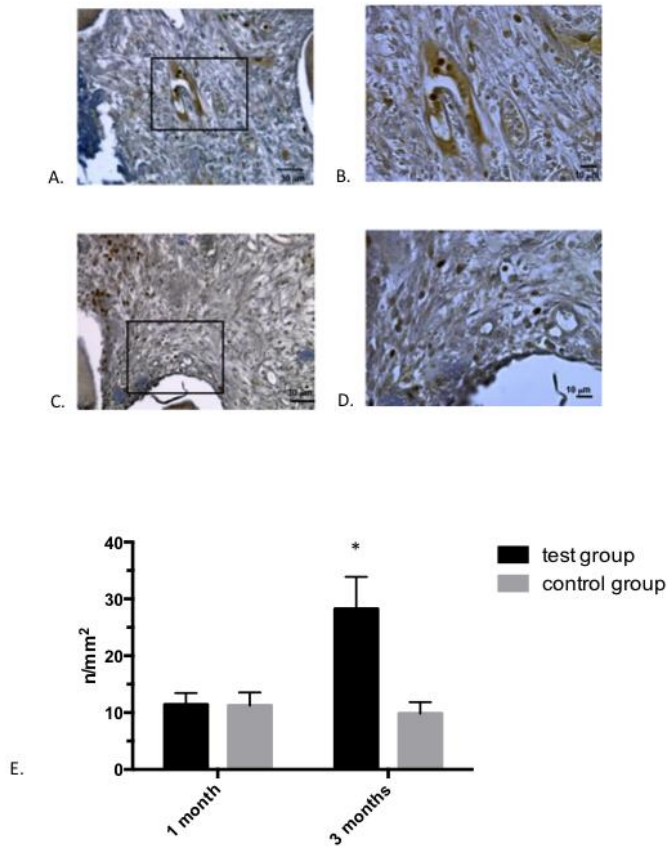


Figura 4. A-D. Capillari sanguigni riconoscibili dalla colorazione immunohistochemica marrone di FVIII rivelato da DAB in un campione del gruppo test (A-B) e del gruppo controllo (C-D) a 3 mesi. Microscopia ottica, ingrandimento originale 20X (A;C), 40X (B;D). E. Tabella che riporta i valori di densità capillare nei campioni del gruppo test e del gruppo controllo a 1 mese e a 3 mesi. I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ( $p > 0.05$ ).

Figure 5.

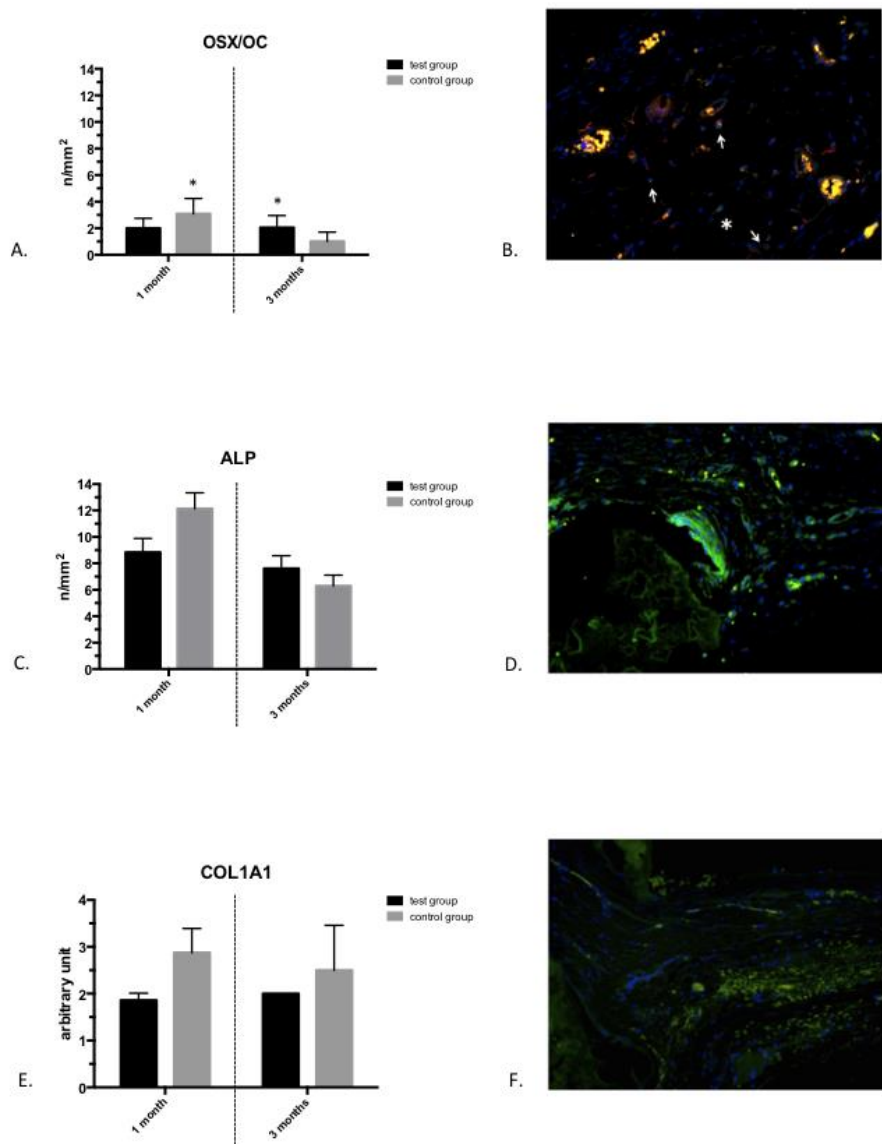


Figura 5. Quantificazione IHC e immagini microscopiche esemplificative a 3 mesi di elementi con co-positività per OSX/OC (A-B), positività per ALP (C-D), positività per COL1A1 (E-F). I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ( $p < 0.05$ ). La positività per OSX (B), ALP (D) e COL1A1 (F) è visualizzata con fluorescenza verde. La positività per OC (B) è visualizzata con fluorescenza rossa. La fluorescenza blu del DAPI (B, D, F) riconosce i nuclei cellulari. Le frecce bianche (B) indicano gli elementi con co-positività per OSX/OC. Microscopia a fluorescenza, ingrandimento originale 20X.

Figure 6.

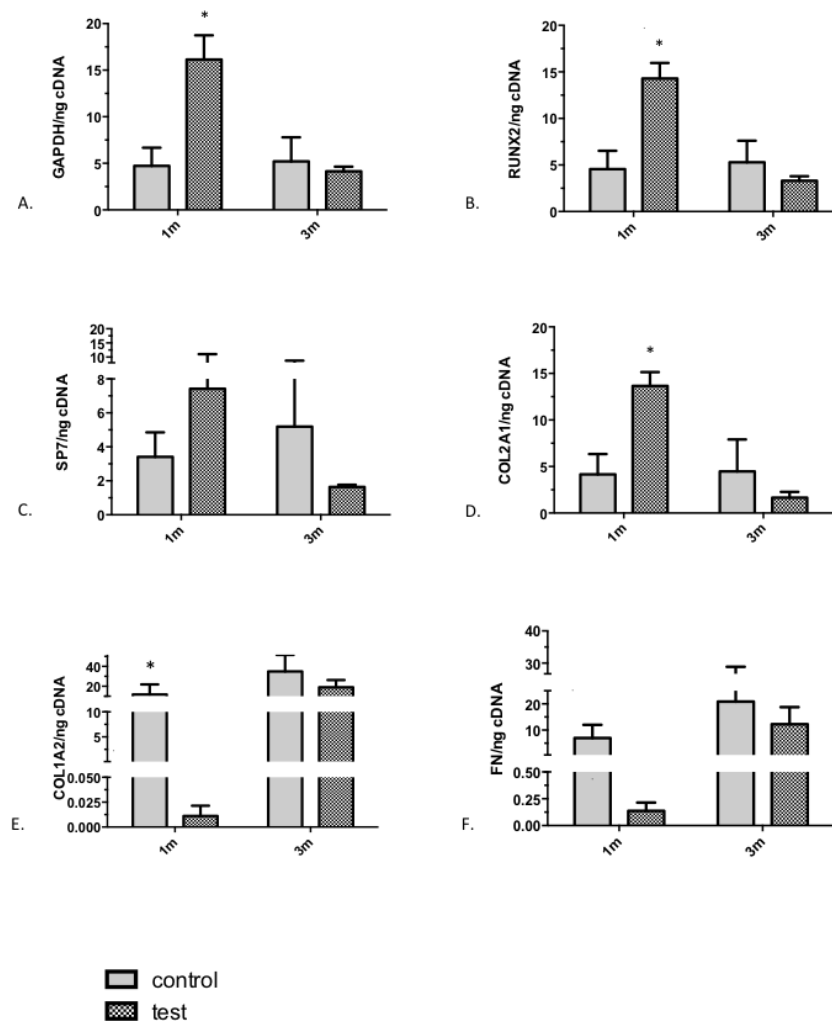


Figura 6. Valutazione con RT-PCR dell'espressione genica di GAPDH (A), RUNX2 (B), SP7 (C), COL2A1 (D), COL1A2 (E), FN (F) nei campioni del gruppo test e del gruppo controllo a 1 e a 3 mesi. I dati sono normalizzati sul quantitativo relativo di cDNA in ogni campione e sono riportati come media  $\pm$  SEM. Gli asterischi indicano significatività statistica test vs ctrl ( $p < 0.05$ ).

## Conclusioni

Questo studio ha permesso di rilevare l'efficacia della somministrazione locale di ST per promuovere la rigenerazione ossea *in vivo*. L'approccio di somministrazione locale utilizzato ha permesso di utilizzare basse dosi di ST in confronto a quelle utilizzate per via parenterale, e conseguentemente il rischio di effetti indesiderati è stato considerevolmente ridotto: precedenti studi di tossicità effettuati *in vivo* su modello di ratto hanno infatti riportato eventi avversi (tossicità epatica, ipertensione, ipertrofia cardiaca, comportamento aggressivo) in risposta a dosi di ST centinaia di volte superiori a quelle da noi impiegate [38] [39] [40] [41] [42].

La maggiore quantità di osso neoformato (NB) rilevato nei campioni del gruppo test vs controllo a 1 mese può essere infatti considerata indicativa di una stimolazione dell'osteogenesi indotta dal farmaco. Inoltre, l'elevato tasso di apposizione minerale (MAR) osservato nei campioni test a 1 mese ha rivelato la persistenza di un'attività di mineralizzazione della matrice a questo time-point [43]. E' stata riportata in letteratura una regolazione positiva del metabolismo osseo mediata dallo ST, che aumenterebbe il rimodellamento osseo ed incrementerebbe la formazione ossea endocorticale [44]. L'analisi dell'espressione del gene GAPDH tramite RT-PCR ha supportato l'ipotesi di un aumento dell'attività metabolica cellulare come effetto dello ST a 1 mese. Allo stesso modo, la maggiore espressione di RUNX2 e SP7 nei campioni del gruppo test vs controllo ha mostrato evidenza di un commitment osteoblastico in corso, visto che questi geni sono essenziali fattori di trascrizione nel processo di transizione da cellule mesenchimali a condrociti e osteoblasti [45] [46]. Studi in animali hanno precedentemente dimostrato un'intensa espressione di RUNX2 e SP7 durante il processo di guarigione delle fratture sperimentalmente indotte [47]. L'espressione relativamente abbondante del gene COL2A1 nei campioni del gruppo test a 1 mese ha portato ad ipotizzare la presenza di una popolazione cellulare con caratteristiche condroblastiche, dato che questo gene codifica per una forma di collagene fibrillare tipica della cartilagine [48] [49]. Considerando anche che la sovraespressione di RUNX2 che abbiamo osservato nel gruppo test è stata precedentemente associata allo sviluppo di condrociti ipertrofici durante l'ossificazione endocorticale [50] [51] e che l'aumento della GAPDH è stato correlato con uno shift metabolico indotto da ipossia durante la condrogenesi periostale e la formazione di osso endocorticale [52], non possiamo escludere che nel nostro modello l'osteogenesi non sia avvenuta almeno in parte secondo questo meccanismo. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi indirizzati in modo specifico ad approfondire questa ipotesi. I campioni del gruppo controllo hanno mostrato evidenza di una più lenta integrazione dell'innesto a 1 mese, con NB e MAR significativamente inferiori rispetto al gruppo test ed elevata espressione di geni che contraddistinguono le fasi più precoci della guarigione delle fratture ossee e la deposizione di matrice connettivale fibrosa (i.e. COL1A2, FN) [53][54][55][56][57]. Le differenze morfometriche osservate ad 1 mese tra test vs controllo non sono risultate presenti a 3 mesi di osservazione; non possiamo escludere che a questo time-point lo ST sia stato completamente metabolizzato e conseguentemente rimosso dall'area del difetto. Stando a questa ipotesi, si potrebbe supporre che il fisiologico processo di guarigione della sede di innesto abbia portato la neoformazione ossea nel gruppo controllo ai livelli di quella del gruppo test. Alcune differenze tra test e controllo sono state rilevate quanto alla composizione dei tessuti neoformati: in particolare, i campioni del gruppo test hanno mostrato un progressivo incremento della densità capillare da 1 a 3 mesi, dato che evidenzia un tessuto vitale in attivo rimaneggiamento. D'altra parte, i campioni del gruppo controllo hanno presentato una densità capillare pressochè invariata nel tempo, suggerendo la presenza di un tessuto più stabilizzato. Similmente, la diminuzione delle positività IHC per OSX/OC e di ALP osservata nei campioni del gruppo controllo da 1 a 3 mesi potrebbe indicare una progressiva riduzione dell'osteogenesi a favore di una stabilizzazione cicatriziale della ferita chirurgica.

In conclusione, la somministrazione locale di ST ha migliorato la neoformazione ossea nella fase precoce di guarigione di difetti critici in calvaria di ratto. Stando ai nostri risultati, può anche essere ipotizzato un effetto più a lungo termine dello ST, che potrebbe mantenere attivo il rimodellamento tissutale, favorendo l'angiogenesi e riducendo la formazione di cicatrici. Ulteriori studi sono necessari per portare la somministrazione locale di androgeni nelle procedure cliniche di rigenerazione ossea.

## Bibliografia

- [1] B. L. Clarke and S. Khosla, "Androgens and bone," *Steroids*, vol. 74, no. 3, pp. 296–305, Mar. 2009.
- [2] K. M. Wren, "Androgens and bone growth: it's location, location, location," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 5, no. 6, pp. 626–632, Dec. 2005.
- [3] R. Marcus, D. Leary, D. L. Schneider, E. Shane, M. Favus, and C. A. Quigley, "The contribution of



testosterone to skeletal development and maintenance: lessons from the androgen insensitivity syndrome,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 3, pp. 1032–1037, Mar. 2000.

[4] B. L. Riggs, S. Khosla, and L. J. Melton, “Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton,” *Endocr. Rev.*, vol. 23, no. 3, pp. 279–302, Jun. 2002.

[5] S. Kousteni, T. Bellido, L. I. Plotkin, C. A. O’Brien, D. L. Bodenner, L. Han, K. Han, G. B. DiGregorio, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, P. K. Roberson, R. S. Weinstein, R. L. Jilka, and S. C. Manolagas, “Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity,” *Cell*, vol. 104, no. 5, pp. 719–730, Mar. 2001.

[6] X. Chen, Y. Deng, Z. Zhou, Q. Tao, J. Zhu, X. Li, J. Chen, and J. Hou, “17 $\beta$ -estradiol combined with testosterone promotes chicken osteoblast proliferation and differentiation by accelerating the cell cycle and inhibiting apoptosis in vitro,” *Vet. Res. Commun.*, vol. 34, no. 2, pp. 143–152, Feb. 2010.

[7] L. Wang, Y.-D. Wang, W.-J. Wang, Y. Zhu, and D.-J. Li, “Dehydroepiandrosterone improves murine osteoblast growth and bone tissue morphometry via mitogen-activated protein kinase signaling pathway independent of either androgen receptor or estrogen receptor,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 38, no. 4, pp. 467–479, Apr. 2007.

[8] C. H. Kasperk, J. E. Wergedal, J. R. Farley, T. A. Linkhart, R. T. Turner, and D. J. Baylink, “Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro,” *Endocrinology*, vol. 124, no. 3, pp. 1576–1578, Mar. 1989.

[9] D. J. Benz, M. R. Haussler, M. A. Thomas, B. Speelman, and B. S. Komm, “High-affinity androgen binding and androgenic regulation of  $\alpha$  1(I)-procollagen and transforming growth factor- $\beta$  steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells,” *Endocrinology*, vol. 128, no. 6, pp. 2723–2730, Jun. 1991.

[10] C. H. Kasperk, G. K. Wakley, T. Hierl, and R. Ziegler, “Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro,” *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 464–471, Mar. 1997.

[11] M. Takeuchi, H. Kakushi, and M. Tohkin, “Androgens directly stimulate mineralization and increase androgen receptors in human osteoblast-like osteosarcoma cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 204, no. 2, pp. 905–911, Oct. 1994.

[12] D. M. Huber, A. C. Bendixen, P. Pathrose, S. Srivastava, K. M. Dienger, N. K. Shevde, and J. W. Pike, “Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor,” *Endocrinology*, vol. 142, no. 9, pp. 3800–3808, Sep. 2001.

[13] L. Pederson, M. Kremer, J. Judd, D. Pascoe, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs, and M. J. Oursler, “Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 2, pp. 505–510, Jan. 1999.

[14] E. E. Joss, K. A. Zuppinger, and E. H. Sobel, “Effect of testosterone propionate and methyl testosterone on growth and skeletal maturation in rats,” *Endocrinology*, vol. 72, pp. 123–130, Jan. 1963.

[15] E. Howard, “Effects of steroids on epiphysiodiaphysial union in prepuberal mice,” *Endocrinology*, vol. 72, pp. 11–18, Jan. 1963.

[16] M. Gunness and E. Orwoll, “Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchietomy in mature rats,” *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 10, no. 11, pp. 1735–1744, Nov. 1995.

[17] L. Vandenput, J. V. Swinnen, S. Boonen, E. Van Herck, R. G. Erben, R. Bouillon, and D. Vanderschueren, “Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model,” *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 19, no. 9, pp. 1462–1470, Sep. 2004.

[18] C. S. Wink and W. J. Felts, “Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 32, no. 1, pp. 77–82, 1980.

- [19] M. Verhas, A. Schoutens, M. L'hermite-Baleriaux, N. Dourov, A. Verschaeren, M. Mone, and A. Heilporn, "The effect of orchidectomy on bone metabolism in aging rats," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 39, no. 2, pp. 74–77, Aug. 1986.
- [20] R. G. Erben, J. Eberle, K. Stahr, and M. Goldberg, "Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 15, no. 6, pp. 1085–1098, Jun. 2000.
- [21] G. K. Wakley, H. D. Schutte, K. S. Hannon, and R. T. Turner, "Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 325–330, Apr. 1991.
- [22] D. Vanderschueren, E. Van Herck, A. M. Suiker, W. J. Visser, L. P. Schot, and R. Bouillon, "Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency," *Endocrinology*, vol. 130, no. 5, pp. 2906–2916, May 1992.
- [23] J. H. Tobias, A. Gallagher, and T. J. Chambers, "5 alpha-Dihydrotestosterone partially restores cancellous bone volume in osteopenic ovariectomized rats," *Am. J. Physiol.*, vol. 267, no. 6 Pt 1, pp. E853–859, Dec. 1994.
- [24] V. Coxam, B. M. Bowman, M. Mecham, C. M. Roth, M. A. Miller, and S. C. Miller, "Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats," *Bone*, vol. 19, no. 2, pp. 107–114, Aug. 1996.
- [25] C. Martel, A. Sourla, G. Pelletier, C. Labrie, M. Fournier, S. Picard, S. Li, M. Stojanovic, and F. Labrie, "Predominant androgenic component in the stimulatory effect of dehydroepiandrosterone on bone mineral density in the rat," *J. Endocrinol.*, vol. 157, no. 3, pp. 433–442, Jun. 1998.
- [26] D. Vanderschueren, L. Vandenput, S. Boonen, E. Van Herck, J. V. Swinnen, and R. Bouillon, "An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement," *Endocrinology*, vol. 141, no. 5, pp. 1642–1647, May 2000.
- [27] V. Coxam, B. M. Bowman, M. Mecham, C. M. Roth, M. A. Miller, and S. C. Miller, "Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats," *Bone*, vol. 19, no. 2, pp. 107–114, Aug. 1996.
- [28] S. Bertelloni, G. I. Baroncelli, R. Battini, G. Perri, and G. Saggese, "Short-term effect of testosterone treatment on reduced bone density in boys with constitutional delay of puberty," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 10, no. 10, pp. 1488–1495, Oct. 1995.
- [29] A. M. Kenny, A. Kleppinger, K. Annis, M. Rathier, B. Browner, J. O. Judge, and D. McGee, "Effects of transdermal testosterone on bone and muscle in older men with low bioavailable testosterone levels, low bone mass, and physical frailty," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 58, no. 6, pp. 1134–1143, Jun. 2010.
- [30] C. Wang, R. S. Swerdloff, A. Iranmanesh, A. Dobs, P. J. Snyder, G. Cunningham, A. M. Matsumoto, T. Weber, and N. Berman, "Effects of transdermal testosterone gel on bone turnover markers and bone mineral density in hypogonadal men," *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 54, no. 6, pp. 739–750, Jun. 2001.
- [31] M. De Rosa, L. Paesano, V. Nuzzo, S. Zarrilli, A. Del Puente, P. Oriente, and G. Lupoli, "Bone mineral density and bone markers in hypogonadotropic and hypergonadotropic hypogonadal men after prolonged testosterone treatment," *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 24, no. 4, pp. 246–252, Apr. 2001.
- [32] R. Vaishnav, J. N. Beresford, J. A. Gallagher, and R. G. Russell, "Effects of the anabolic steroid stanozolol on cells derived from human bone," *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979, vol. 74, no. 5, pp. 455–460, May 1988.
- [33] J. Liao, T. Wu, Q. Li, B. Hu, L. Huang, Z. Li, L. Yuan, and S. Zhong, "Effects of stanozolol on bone mineral density and bone biomechanical properties of osteoporotic rats," *1 Jun Yi Xue Xue Bao Acad. J. First Med. Coll. PLA*, vol. 23, no. 11, pp. 1117–1120, Nov. 2003.
- [34] C. H. Chesnut, J. L. Ivey, H. E. Gruber, M. Matthews, W. B. Nelp, K. Sisom, and D. J. Baylink, "Stanozolol in postmenopausal osteoporosis: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action,"

*Metabolism.*, vol. 32, no. 6, pp. 571–580, Jun. 1983.

[35] K. J. R. da Costa, J. J. Passos, A. D. M. Gomes, R. D. Sinisterra, C. R. M. Lanza, and M. E. Cortés, “Effect of testosterone incorporation on cell proliferation and differentiation for polymer-bioceramic composites,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 11, pp. 2751–2759, Nov. 2012.

[36] A. Spadari, N. Romagnoli, P. G. Predieri, P. Borghetti, A. M. Cantoni, and A. Corradi, “Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 94, no. 3, pp. 379–387, Jun. 2013.

[37] S. A. Bustin, “Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 25, no. 2, pp. 169–193, Oct. 2000.

[38] F. Matrisciano, A. M. E. Modafferi, G. I. Togna, Y. Barone, G. Pinna, F. Nicoletti, and S. Scaccianoce, “Repeated anabolic androgenic steroid treatment causes antidepressant-reversible alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, BDNF levels and behavior,” *Neuropharmacology*, vol. 58, no. 7, pp. 1078–1084, Jun. 2010.

[39] M. Y. McGinnis, A. R. Lumia, M. E. Breuer, and B. Possidente, “Physical provocation potentiates aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids,” *Horm. Behav.*, vol. 41, no. 1, pp. 101–110, Feb. 2002.

[40] L. D. Boada, M. Zumbado, S. Torres, A. López, B. N. Díaz-Chico, J. J. Cabrera, and O. P. Luzardo, “Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats,” *Arch. Toxicol.*, vol. 73, no. 8–9, pp. 465–472, Nov. 1999.

[41] A. Beutel, C. T. Bergamaschi, and R. R. Campos, “Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 93, no. 1, pp. 43–48, Jan. 2005.

[42] S. Pieretti, M. Mastriota, P. Tucci, G. Battaglia, L. Trabace, F. Nicoletti, and S. Scaccianoce, “Brain nerve growth factor unbalance induced by anabolic androgenic steroids in rats,” *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 45, no. 1, pp. 29–35, Jan. 2013.

[43] D. J. Lee, R. Padilla, H. Zhang, W.-S. Hu, and C.-C. Ko, “Biological assessment of a calcium silicate incorporated hydroxyapatite-gelatin nanocomposite: a comparison to decellularized bone matrix,” *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 837524, 2014.

[44] M. N. Benéton, A. J. Yates, S. Rogers, E. V. McCloskey, and J. A. Kanis, “Stanozolol stimulates remodelling of trabecular bone and net formation of bone at the endocortical surface,” *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979, vol. 81, no. 4, pp. 543–549, Oct. 1991.

[45] G. Karsenty, “Transcriptional control of skeletogenesis,” *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 9, pp. 183–196, 2008.

[46] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer, and B. de Crombrughe, “The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation,” *Cell*, vol. 108, no. 1, pp. 17–29, Jan. 2002.

[47] X. Li, H. Wang, E. Touma, E. Rousseau, R. J. Quigg, and J. T. Ryaby, “Genetic network and pathway analysis of differentially expressed proteins during critical cellular events in fracture repair,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 100, no. 2, pp. 527–543, Feb. 2007.

[48] J. F. Talts, A. Pfeifer, F. Hofmann, E. B. Hunziker, X. H. Zhou, A. Aszódi, and R. Fässler, “Endochondral ossification is dependent on the mechanical properties of cartilage tissue and on intracellular signals in chondrocytes,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 857, pp. 74–85, Oct. 1998.

[49] P. U. Rani, E. Stringa, R. Dharmavaram, D. Chatterjee, R. S. Tuan, and J. S. Khillan, “Restoration of normal bone development by human homologue of collagen type II (COL2A1) gene in Col2a1 null mice,” *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, vol. 214, no. 1, pp. 26–33, Jan. 1999.

[50] Y.-F. Dong, D. Y. Soung, E. M. Schwarz, R. J. O’Keefe, and H. Drissi, “Wnt induction of chondrocyte

hypertrophy through the Runx2 transcription factor,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 208, no. 1, pp. 77–86, Jul. 2006.

[51] H. Ding, T. Wang, D. Xu, B. Cha, J. Liu, and Y. Li, “Dexamethasone-induced apoptosis of osteocytic and osteoblastic cells is mediated by TAK1 activation,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Mar. 2015.

[52] P. J. Emans, F. Spaapen, D. A. M. Surtel, K. M. Reilly, A. Cremers, L. W. van Rhijn, S. K. Bulstra, J. W. Voncken, and R. Kuijer, “A novel in vivo model to study endochondral bone formation; HIF-1alpha activation and BMP expression,” *Bone*, vol. 40, no. 2, pp. 409–418, Feb. 2007.

[53] K. S. Midwood, L. V. Williams, and J. E. Schwarzbauer, “Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, no. 6, pp. 1031–1037, Jun. 2004.

[54] E. Oku, T. Kanaji, Y. Takata, K. Oshima, R. Seki, S. Morishige, R. Imamura, K. Ohtsubo, M. Hashiguchi, K. Osaki, K. Yakushiji, K. Yoshimoto, H. Ogata, H. Hamada, K. Izuhara, M. Sata, and T. Okamura, “Periostin and bone marrow fibrosis,” *Int. J. Hematol.*, vol. 88, no. 1, pp. 57–63, Jul. 2008.

[55] S. C. Heo, W. C. Shin, M. J. Lee, B. R. Kim, I. H. Jang, E.-J. Choi, J. S. Lee, and J. H. Kim, “Periostin accelerates bone healing mediated by human mesenchymal stem cell-embedded hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffold,” *PloS One*, vol. 10, no. 3, p. e0116698, 2015.

[56] D. S. Steinbrech, B. J. Mehrara, N. M. Rowe, M. E. Dudziak, J. S. Luchs, P. B. Saadeh, G. K. Gittes, and M. T. Longaker, “Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 105, no. 6, pp. 2028–2038, May 2000.

[57] S. Chujo, F. Shirasaki, S. Kawara, Y. Inagaki, T. Kinbara, M. Inaoki, M. Takigawa, and K. Takehara, “Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 203, no. 2, pp. 447–456, May 2005.

Riferimento

Giulia Ghiacci

E-mail: [giulia.ghiacci@gmail.com](mailto:giulia.ghiacci@gmail.com)

## **RIALZO DEL SENO MASCELLARE CON APPROCCIO LATERALE: FINESTRA OSSEA PICCOLA VS. FINESTRA GRANDE. STUDIO CLINICO RANDOMIZZATO SPLIT-MOUTH**

**Nicola Baldini\*, Andrea Bianco\*, Cecilia Goracci\*, Massimo de Sanctis°, Marco Ferrari\***

*\*Dipartimento di Odontostomatologia, Tuscan School of Dental Medicine, Università di Siena*

*°Dipartimento di Parodontologia, Università Vita e Salute San Raffaele, Milano*

### **Riassunto**

**Introduzione:** Lo studio ha l'obiettivo di testare, attraverso un disegno randomizzato split-mouth, una finestra mini-invasiva di accesso al seno mascellare. **Materiali e metodi:** Sedici pazienti sono stati sottoposti a un intervento di rialzo del seno bilaterale con approccio laterale seguendo due diverse procedure: nel lato Test una finestra di 6x6mm ed un nuovo strumento per il riempimento della cavità, nel lato Controllo una finestra di 10x8mm ed il riempimento manuale del seno. Sono state misurate l'altezza e lo spessore dell'osso residuo sulle scansioni TAC preoperatorie e a 6 mesi dall'intervento usando riferimenti radiopachi su dime radiologiche. La durata di ogni intervento è stata misurata. Un questionario è stato sottoposto a tutti i pazienti per valutare il discomfort post-operatorio a 7, 14 e 30 giorni. **Risultati:** Con entrambe le procedure è stato ottenuto un significativo incremento osseo in altezza e in spessore; non sono emerse differenze significative tra i due lati trattati. Non sono state dimostrate differenze significative nella durata degli interventi. Dai questionari è emersa una preferenza per la procedura Test, relativamente alle valutazioni a 7 e 14 e a 30 giorni. **Conclusioni:** La procedura testata ha ottenuto una ricostruzione ossea sovrapponibile a quella della tecnica di riferimento. Non ci sono state differenze nei tempi di trattamento. L'opinione dei pazienti ha mostrato una preferenza per la tecnica mini-invasiva nelle prime fasi di guarigione.

### **Introduzione**

Le procedure di rialzo del seno mascellare si sono dimostrate tecniche affidabili di ricostruzione delle creste alveolari atrofiche nella zona mascellare superiore posteriore (Boyne & James 1980, and Tatum 1986, Wallace 2003, Pjetursson 2008). Negli ultimi 20 anni questa tecnica è stata ampiamente documentata sotto diversi aspetti: preparazione del sito chirurgico, materiali da innesto, quantità e qualità dell'osso ricostruito, posizionamento degli impianti, gestione delle complicanze, successo a lungo termine degli impianti inseriti post rialzo del seno (Jensen 1996, Khoury 1999, Testori 2005, Schwarz-Arad 2004, Tarnow 2000).

Concentrando l'attenzione sull'aspetto chirurgico, l'apertura della finestra ossea ed il sollevamento della membrana di Schneider rappresentano generalmente le fasi più complesse di tutto il trattamento a causa della possibilità di arrecare un danno alla membrana stessa (Wallace et al 2007). Per queste ragioni, allo scopo di assicurare un'adeguata visualizzazione dell'area d'intervento e di prevenire possibili complicanze, molti autori hanno proposto un lembo grande, che espone completamente la parete laterale del seno mascellare, ed una finestra ossea ampia per facilitare l'accesso alla cavità sinusale. Solo alcuni studi però hanno fornito delle indicazioni precise sulle dimensioni della finestra d'accesso: una lunghezza di 10-15mm ed una larghezza di 8-10mm sono state descritte in uno studio clinico (Vercellotti et al 2001), mentre approcci più grandi sono stati effettuati in altre ricerche (Zitmann 1998, Barone 2007, Lambert 2010). Un recente case series (Pariente et al 2014) presenta un approccio più conservativo: questa tecnica consiste nell'apertura di due finestre, una mesiale di circa 8x5mm ed una distale più piccola. Un'altra ricerca (Nickenig et al 2014) ha mostrato una finestra ossea mini-invasiva in combinazione con una tecnica di inserimento immediato flapless degli impianti con chirurgia computer guidata.

Testori & Wallace (2005) hanno indicato 20x15mm come dimensioni corrette per la finestra di accesso al seno, anche se gli stessi autori sottolineano che in mani esperte approcci più conservativi possono presentare diversi vantaggi, tra cui una miglior protezione del materiale innestato e la conservazione della parete ossea originale.

Altri autori (Simonpieri 2011) sostengono infatti che una finestra ossea ampia possa ridurre il potenziale di guarigione del materiale innestato e facilitare la penetrazione di tessuto connettivale all'interno del seno mascellare. La parete laterale del seno potrebbe avere un ruolo nella guarigione dell'innesto, sia meccanicamente, come stabilizzazione e protezione del coagulo, sia biologicamente, come fronte attivo di osteoblasti che possono colonizzare lo spazio occupato dal materiale innestato (Schenk 1987, Misch 1993). Il processo di guarigione dell'innesto, infatti, inizia dalle pareti ossee laterali e progressivamente prosegue colonizzando la zona centrale dell'innesto stesso (Haas et al 2002).

L'obiettivo di questo lavoro è quello di testare, attraverso uno studio clinico randomizzato split-mouth, se una riduzione delle dimensioni della finestra di accesso al seno mascellare, con approccio laterale, possa



determinare: 1 un risultato migliore rispetto ad una finestra grande relativamente all'altezza e allo spessore della ricostruzione ossea, 2 una riduzione del discomfort del paziente e delle complicanze chirurgiche.

Le ipotesi nulle testate sono: 1 c'è un maggior incremento nella quantità di osso ricostruito nei casi dove è stata utilizzata la finestra ossea più conservativa, 2 non c'è differenza nel discomfort dei pazienti tra le due tecniche di accesso al seno mascellare.

### Materiali e metodi

I pazienti di questo studio sono stati selezionati tra i pazienti richiedenti un trattamento implanto-protesico presso il Dipartimento di Parodontologia dell'Università degli Studi di Siena. Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'"Azienda Ospedaliera – Universitaria Senese", Ospedale "Le Scotte" di Siena ed è stato condotto seguendo i dettami della "Dichiarazione di Helsinki". Tutte le caratteristiche dello studio sono state spiegate ai pazienti al momento di firmare il consenso informato. Lo studio è stato registrato sul sito "clinicaltrial.gov" con il seguente numero seriale: NCT02117882. Lo studio segue le linee guida del CONSORT statement 2010 per migliorare la qualità delle ricerche cliniche randomizzate (Tabella 1). Sedici pazienti (7 maschi, 9 femmine, età media 57.56 ± 8.7, range 44-76) sono stati selezionati per partecipare allo studio nel periodo tra Settembre 2013 e Giugno 2014.

Tutti i pazienti hanno completato la visita ed il controllo radiografico a 6 mesi dall'intervento entro Dicembre 2014 con l'eccezione del paziente #13 che non ha preso parte al controllo a 6 mesi per ragioni personali (Tabella 1).

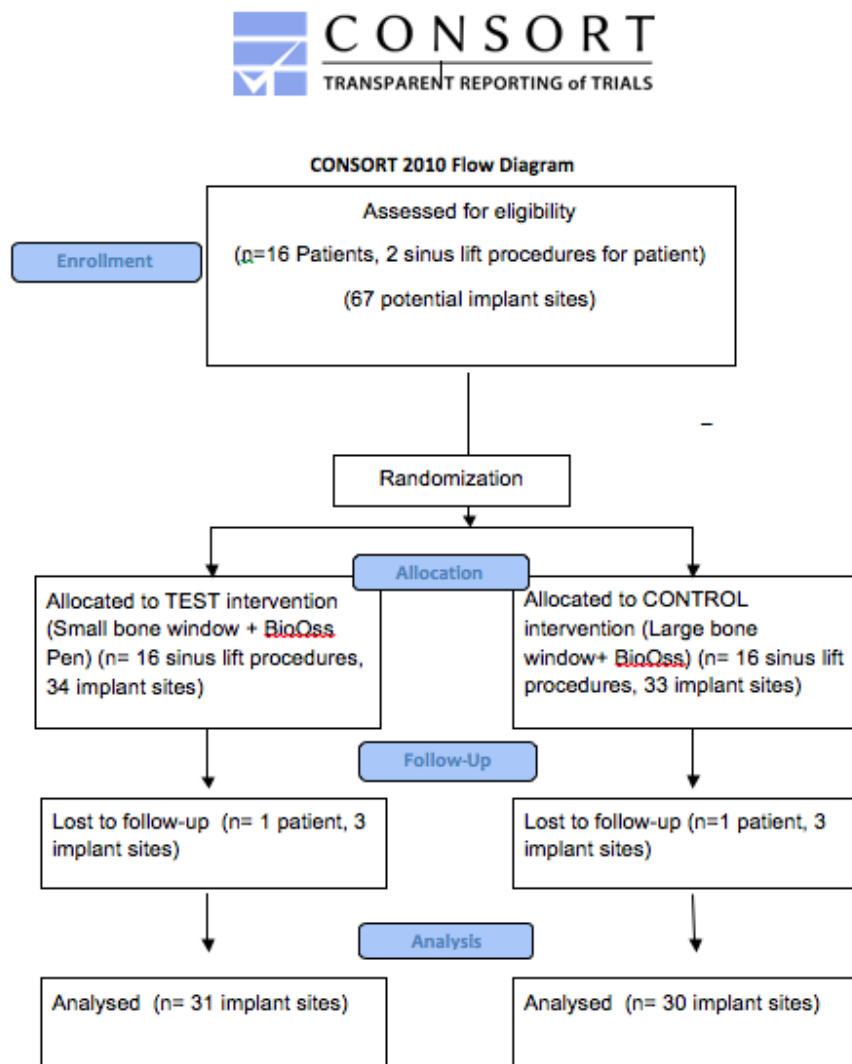


Tabella 1: Schema dello studio

I criteri di inclusione dello studio sono stati: buona salute generale, assenza di malattia parodontale o un parodonto sano dopo terapia parodontale, condizione di edentulia bilaterale nella zona mascellare posteriore con una quantità di osso residuo insufficiente per la terapia implantare.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad una seduta di igiene e profilassi con istruzioni per il corretto mantenimento igienico. Il trattamento chirurgico non è stato programmato fino a quando il paziente non mostrava un corretto controllo di placca sopragengivale.

I criteri di esclusione sono stati: patologie sistemiche, patologia miocardica recente, problemi di coagulazione, disordini metabolici, terapia con bifosfonati, fumo di sigaretta (più di 10 sigarette al giorno), alcolismo, patologia del seno mascellare, precedente chirurgia del seno mascellare.

#### **Disegno dello studio**

Ciascun paziente è stato sottoposto ad un intervento di rialzo del seno bilaterale con approccio laterale seguendo due procedure diverse:

Lato Test: piccola finestra di accesso+ inserimento innesto con uno strumento speciale.

Lato Controllo: finestra di accesso grande+inserimento innesto con tecnica manuale.

Una volta prese le impronte e colati i modelli, sono state preparate delle dime radiologiche per ogni paziente. In ogni dima sono stati inseriti diversi riferimenti radiopachi, uno per ogni posizione degli impianti programmati dal piano di trattamento del paziente. Lo scopo dei riferimenti è quello di ottenere delle misure ripetibili su scansioni TAC eseguite sullo stesso paziente in diversi momenti del trattamento ricostruttivo.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una TAC preoperatoria: un'attenzione particolare è stata dedicata a far indossare correttamente la dima al momento dell'esame radiografico.

Prima della chirurgia ai pazienti è stato richiesto uno sciacquo di clorexidina allo 0,2% per circa 1 minuto.

Tutte le procedure chirurgiche sono state eseguite dallo stesso operatore (NB).

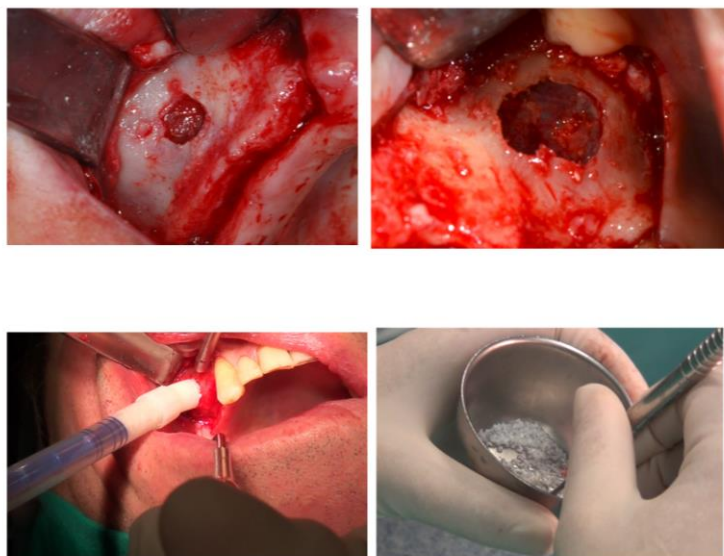
#### **Lato Test**

Dopo aver effettuato un'anestesia locale, è stato disegnato un lembo mucoperiosteale a spessore totale. Prima di effettuare l'incisione la parete laterale del seno mascellare è stata ispezionata attentamente in modo da localizzare l'area più idonea per l'apertura della finestra di accesso.

Il lembo era di tipo trapezoidale, disegnato per esporre un'area centrale di 6x6mm (la finestra ossea) ed una superficie ossea periferica di almeno altri 4mm per lato.

L'incisione crestale e le incisioni di rilascio sono state bisellate per incrementare la superficie connettivale in modo da facilitare la stabilizzazione delle suture e della membrana in collagene.

Una volta scollato il lembo, è stata preparata una finestra ossea di 6x6mm, utilizzando uno strumento piezoelettrico (Mectron Piezosurgery System, Genova, Italy), per accedere al seno mascellare (Figura 1).



**Figura 1:** A destra la procedura del lato Test, a sinistra il lato Controllo

Le dimensioni della finestra ossea sono state misurate utilizzando una sonda parodontale (CPC15 Hu-Friedy, Leinmen Germany).

La parete ossea è stata erosa progressivamente fino ad esporre la membrana di Schneider in un'area dalle dimensioni approssimative di 6x6mm. La membrana sinusale è stata sollevata partendo dal margine inferiore dell'area osteotomica ed è stata scollata completamente dalla parete inferiore e dalla parete mediale del seno.

Il seno è stato innestato con osso bovino deproteinizzato (granulometria 1-2mm) utilizzando un nuovo strumento per veicolare il materiale direttamente all'interno della cavità (Bio-Oss Pen, Geistlich Pharma Wolhusen Switzerland) (Figura 1) e la finestra ossea è stata coperta da una membrana in collagene (Bio-Gide Geistlich Pharma Wolhusen Switzerland) (Ferreira 2009).

La membrana in collagene è stata suturata, ancorandola alle superfici connettivali precedentemente esposte nelle aree periferiche del lembo, e il lembo è stato suturato con suture a materassaio e punti staccati, utilizzando suture 5/0 riassorbibili (Vicryl, Ethicon, Somerville, NewJersey, US).

#### ***Lato Controllo***

Dopo aver effettuato un'anestesia locale, è stato disegnato un lembo mucoperiosteo a spessore totale e la parete laterale del seno mascellare è stata esposta. Una finestra ossea di circa 10x8mm è stata preparata utilizzando uno strumento piezoelettrico (Mectron Piezosurgery System, Genova, Italy), in modo da consentire lo scollamento della membrana di Schneider (Figura 1). Il seno è stato innestato con osso bovino deproteinizzato (granulometria 1-2mm) (Bio-Oss Geistlich Pharma Wolhusen Switzerland), utilizzando strumenti manuali ed avendo cura di evitare un eccessivo compattamento del materiale. La finestra ossea è stata coperta da una membrana in collagene (Bio-Gide Geistlich Pharma Wolhusen Switzerland). Il lembo è stato suturato con suture a materassaio e punti staccati, utilizzando suture 5/0 riassorbibili (Vicryl, Ethicon, Somerville, NewJersey, US).

#### ***Protocollo post-chirurgico***

A tutti i pazienti è stata somministrata una terapia antibiotica prima dell'intervento, 2gr di amoxicillina, e per i successivi 5 giorni (2gr di amoxicillina al giorno). Sono stati consigliati sciacqui di clorexidina due volte al giorno per 21 giorni dopo l'intervento. Le suture sono state rimosse dopo 14 giorni. L'utilizzo di protesi removibili non è stato permesso fino al momento della ribasatura e comunque non prima di 2 settimane dall'intervento.

#### ***Follow-up***

I pazienti sono stati richiamati per controllo al giorno 7, 14, 30 e 180 dall'intervento.

Ogni 3 mesi i pazienti sono stati sottoposti ad una seduta di igiene professionale.

A 6 mesi dall'intervento è stata effettuata la TAC di controllo, posizionando la dima radiologica utilizzata per la TAC prechirurgica.

#### ***Randomizzazione***

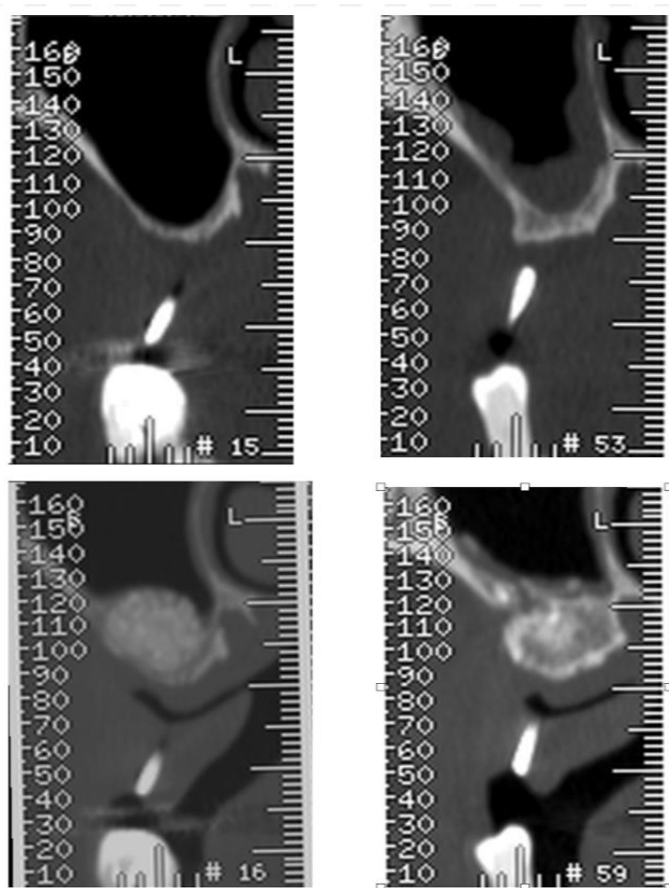
La randomizzazione dei siti chirurgici è stata effettuata immediatamente prima dell'intervento. Un clinico non coinvolto direttamente nell'intervento apriva una serie di buste numerate da 1 a 16 contenenti l'indicazione dei siti da trattare. I pazienti, i misuratori e lo statistico erano in cieco.

#### ***Misurazioni radiografiche***

L'obiettivo primario dello studio era quello di misurare l'altezza e lo spessore della cresta ossea ricostruita attraverso la procedura mini-invasiva e la procedura tradizionale.

Le misurazioni sono state effettuate sulle scansioni TAC preoperatorie e postoperatorie a 6 mesi.

Per ottenere misure ripetibili sono stati utilizzati riferimenti radiopachi sulle dime radiologiche (Figura 2).



**Figura 2: Misurazioni radiografiche: a destra lato Test, a sinistra Controllo**

Un misuratore (CD) in cieco ha effettuato tutte le misurazioni radiografiche.

Sono stati misurati i seguenti parametri in corrispondenza dei riferimenti radiopachi: altezza dell'osso residuo, ampiezza dell'osso residuo. Lo spessore della parete laterale del seno è stata misurata al centro dell'area della finestra ossea.

L'incremento osseo postchirurgico è stato calcolato per sottrazione: altezza ossea postchirurgica – altezza ossea prechirurgica.

Tutte le misurazioni sono state effettuate utilizzando un software di analisi delle immagini (NIS-elements software; Nikon, Tokyo, Japan).

#### **Tempi di intervento**

Un obiettivo secondario del lavoro era quello di misurare le tempistiche delle due tipologie di intervento. Un clinico non coinvolto direttamente nella procedura chirurgica (AB) ha misurato i tempi degli interventi:

- ☐ Tempo totale di intervento dall'incisione all'ultima sutura (minuti).
- ☐ Tempo parziale di apertura della finestra ossea (secondi).
- ☐ Tempo parziale di scollamento della membrana (secondi).
- ☐ Tempo parziale di riempimento della cavità sinusale (secondi).

#### **Valutazione del paziente**

L'opinione dei pazienti è stata registrata utilizzando una scala VAS. I pazienti non erano a conoscenza di quale fosse il lato Test e il lato Controllo. A tutti i pazienti è stato somministrato un questionario che valutava il discomfort postoperatorio nelle aree trattate chirurgicamente. Ai pazienti è stato richiesto un giudizio generale sul dolore e gonfiore postoperatorio a 7, 14 e 30 giorni dall'intervento. La scala VAS era una linea di 10cm che rappresentava uno spettro di valutazione da 0% (nessun discomfort) al 100% (discomfort molto rilevante): il segno fatto dal paziente è stato misurando in millimetri partendo da sinistra al millimetro e considerato come percentuale.

**Metodi statistici**

Tutte le valutazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il software Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 18 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Nelle statistiche descrittive i valori della media e della deviazione standard sono stati calcolati per le variabili numeriche con una distribuzione normale, mentre nel caso di dati ordinali o con distribuzione non normale sono stati utilizzati i valori della mediana e del range interquartile.

Per valutare l'omogeneità dei dati prechirurgici nei due gruppi relativamente alle misurazioni di "altezza ossea residua" e "spessore osseo residuo" è stato utilizzato un t-test per ognuna delle variabili considerate (Tabella 2).

Gruppo	Test (N)	Control (N)	pvalue
Altezza ossea residua (mm)	3.10±0.93(34)	3.39±1.22(33)	p=0.27 non statisticamente significativo
Spessore osseo residuo (mm)	5.17±1.41(34)	5.39±1.96(33)	p=0.59 non statisticamente significativo
Spessore parete laterale (mm)	1.25±0.54(16)	1.4±0.52(16)	p=0.25 non statisticamente significativo
	Mediana 1 Range Interquartile 1-1.5	Mediana 1.5 Range Interquartile 1-1.5	

**Tabella 2: Dimensioni preoperatorie della cresta ossea residua. Tutte le misure sono in millimetri**

Per valutare lo spessore della parete laterale del seno mascellare prima dell'intervento chirurgico tra i gruppi Test e Controllo è stato utilizzato il test Wilcoxon Signed Rank perché i dati non avevano una distribuzione normale. Per le variabili "altezza ossea residua" e "spessore osseo residuo" è stato utilizzato il Paired t-test per valutare la significatività statistica della differenza tra i valori iniziali ed i valori a 6 mesi mentre per evidenziare eventuali differenze tra i due gruppi nei valori della quantità di incremento osseo ( $\Delta$ ) è stato utilizzato il test Mann-Whitney U (Tabella 3).

Gruppo	Test t0 (N)	Test 6 mesi (N)	$\Delta$ incremento osseo (N)	pvalue <sup>1</sup>	Controllo t0 (N)	Controllo 6 mesi (N)	$\Delta$ incremento osseo (N)	pvalue <sup>1</sup>
Altezza ossea residua (mm)	2.93±1.37 (31)	11.64±1.59 (31)	8.71±1.11 (31)	p<0.0001	3.24±1.43 (30)	11.77±1.85 (30)	8.5±2.02 (30)	p<0.0001
pvalue <sup>2</sup>			p=0.88					

<b>Spessore osseo residuo (mm)</b>	<b>5.19±1.51 (31)</b>	<b>9.99±1.37 (31)</b>	<b>4.70±0.58 (31)</b> <b>(Mediana 4.7)</b> <b>Range Interquartile 4.30-5.15)</b>	<b>p&lt;0.0001</b>	<b>5.30±1.95 (30)</b>	<b>9.98±1.74 (30)</b>	<b>4.68±0.70 (30)</b> <b>(Mediana 4.5)</b> <b>Range interquartile 4-5.2</b>	<b>p&lt;0.0001</b>
<b>pvalue<sup>2</sup></b>			<b>p=0.85</b>					

**Tabella 3: Dimensioni ossee dopo il rialzo del seno. Tutte le misure sono in millimetri. I dati a tempo 0 sono stati misurati sulle scansioni TAC preoperatorie, il differenziale dell'incremento osseo  $\Delta$  bone è stato calcolato come la differenza tra il valore misurato in corrispondenza dei riferimenti radiopachi tra la scansione TAC a 6 mesi e la TAC preoperatoria.**

**pvalue<sup>1</sup>: Differenze all'interno dello stesso gruppo tra la TAC preoperatoria e quella a 6 mesi.**

**pvalue<sup>2</sup>: Differenze tra i due gruppi nella TAC a 6 mesi**

Lo stesso test è stato utilizzato per valutare l'incremento dello spessore osseo tra i siti del gruppo Test e Controllo perché i dati non presentavano una distribuzione normale. Il Paired t-test è stato utilizzato per valutare i tempi chirurgici tra le due procedure Test e Controllo (Tabella 4).

<b>Gruppo</b>	<b>N</b>	<b>Tempo totale (min)</b>	<b>Apertura finestra ossea (s)</b>	<b>Scollamento membrana (s)</b>	<b>Riempimento del seno(s)</b>
<b>Test</b>	<b>16</b>	<b>42.62±6.67</b>	<b>145.5±62.74*</b>	<b>199.83±73.19</b>	<b>158.18±39.87*</b>
<b>Controllo</b>	<b>16</b>	<b>41.68±8.34</b>	<b>208.81±43.81*</b>	<b>220.62±81.95</b>	<b>207.06±49.68*</b>
<b>pvalue</b>		<b>p=0.722</b>	<b>p&lt;0.0001</b>	<b>p=0.264</b>	<b>p=0,003</b>

**Tabella 4: Tempi di trattamento: la durata complessiva degli interventi è espresso in minuti, i tempi parziali sono espresso in secondi. \*Differenze intergruppo statisticamente significative**

Il test Wilcoxon Signed Rank è stato utilizzato per valutare la significatività statistica delle differenze relative all'opinione dei pazienti sul discomfort post chirurgico tra il lato Test e Controllo a 7,14 e 30 giorni. In tutte le analisi il livello di significatività era considerato a  $p=0.05$ .

## **Risultati**

Tutti gli interventi hanno avuto successo e sono guariti senza complicanze rilevanti. Si sono verificati alcuni eventi minori: nel gruppo Test in due casi sono stati rilevati setti ossei intrasinosali, ci sono state perforazioni della membrana di Schneider in tre casi e due casi di moderata emorragia.

Nel gruppo Controllo si sono verificati quattro casi di perforazioni e la presenza di setti ossei in tre pazienti. La Tabella 2 mostra le dimensioni ossee residue prima dell'intervento chirurgico: non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi Test e Controllo relativamente alle variabili "altezza ossea residua" e "spessore osseo residuo".

Nel gruppo Test sono stati considerati 31 potenziali siti implantari, nel gruppo Controllo 30.

Nel gruppo Test le dimensioni della finestra ossea erano  $5.75\pm0.6$  mm in lunghezza e  $5.38\pm0.5$  mm in larghezza mentre nel gruppo Controllo rispettivamente  $10.06\pm0.93$  mm e  $7.31\pm0.6$  mm. L'area dell'osteotomia era  $30.9\pm4.4$  mm<sup>2</sup> nel gruppo Test e  $73.7\pm10.1$  mm<sup>2</sup> nel gruppo Controllo.



I risultati delle misurazioni radiografiche a 6 mesi ed i valori differenziali di incremento osseo verticale ed orizzontale sono riassunti nella Tabella 3.

Un incremento osseo significativo è stato ottenuto in entrambi i gruppi sia in senso verticale che orizzontale, nessuna differenza significativa è emersa tra i due tipi di trattamento.

La Tabella 4 mostra i dati relativi ai tempi di trattamento: nessuna differenza significativa è emersa tra le due procedure testate nella durata degli interventi, tuttavia la procedura Test è risultata significativamente più rapida nei tempi parziali di apertura della finestra ossea e di riempimento del seno.

Il questionario sottoposto ai pazienti sul discomfort postoperatorio ha mostrato una significativa preferenza per la procedura Test nelle valutazioni al giorno 7 e 14 e a 30 giorni (Tabella 5).

	Test 7 g	Controllo 7 g	Test 14 g	Controllo 14 g	Test 30g	Controllo 30g
<b>mediana</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>25%</b>	<b>2.5</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>75%</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>
<b>pvalue</b>	<b>0.027*</b>		<b>&lt;0.001*</b>		<b>0.014*</b>	

**Tabella 5: Discomfort del paziente. Diagramma VAS a 7, 14 e 30 giorni**

### Discussione

Un approccio conservativo nei confronti della parete del seno mascellare, durante la chirurgia del rialzo di seno, è stato recentemente proposto da diversi autori. In uno studio recente (Pariente et.al 2014) è stata presentata una tecnica con due mini-finestre: gli autori sottolineano il potenziale osteogenico del mantenimento della parete laterale ed il vantaggio clinico di una maggiore stabilità e protezione del materiale innestato. Uno studio RCT (Nickenig et al. 2014) descrive una finestra mini-invasiva, associata a un lembo di ridotte dimensioni e a un inserimento implantare flapless.

Gli autori riportano una riduzione del gonfiore postoperatorio nel lato testato rispetto al lato controllo dove era stato fatto un lembo trapezoidale convenzionale.

Analizzando i risultati del presente lavoro si può notare come in entrambi i gruppi sia stata ottenuta una sufficiente quantità di ricostruzione ossea: tutti i siti implantari che erano stati programmati all'inizio del trattamento sono stati considerati adeguati all'inserimento degli impianti al controllo a 6 mesi. Per questo motivo la prima ipotesi nulla dello studio, quella di ottenere un maggior incremento osseo con una finestra ridotta, deve essere rifiutata.

Si è verificato un numero significativo di perforazioni della membrana sinusale (21.8% considerando tutti i siti trattati): 3 casi nel gruppo Test e 4 nel gruppo Controllo. Tutte le perforazioni si sono verificate durante le manovre di scollamento della membrana. Questo dato è simile a quelli riportati da altri studi clinici (Barone et al.2008, Lambert et al.2010, Pariente et. Al. 2014), ma è più elevato rispetto ad altri risultati presenti nella letteratura scientifica (Pjetursson et al. 2008, Wallace et al. 2007). In ogni modo, in tutti i casi di perforazione, la procedura chirurgica è stata completata correttamente: le perforazioni sono state gestite attraverso una particolare attenzione nel continuare la manovra di scollamento e applicando successivamente una membrana in collagene all'interno della cavità sinusale (Van der Bergh et al.2000).

In due casi (entrambi nel gruppo Test) si è verificata un'emorragia cospicua a causa della lesione dell'arteria alveolo-antrale, con un'incidenza complessiva ripetuto ai siti trattati del 6.25%. Questo dato è sovrapponibile quanto riportato da un altro lavoro clinico (Lambert et al. 2010). Il sanguinamento è stato gestito con delle manovre compressive e in entrambi i casi l'intervento è stato completato.

Uno degli obiettivi secondari dello studio era quello di valutare possibili differenze nei tempi chirurgici. La durata totale delle due procedure chirurgiche non ha mostrato differenze significative tra Test e Controllo. I tempi parziali di apertura della finestra ossea e di riempimento del seno hanno mostrato una maggior rapidità per la procedura Test. Il risultato può essere determinato da una preparazione più piccola e quindi più rapida della finestra ossea e da un riempimento del seno più diretto, facilitato dal nuovo sistema di trasporto del materiale da innesto, che è stato testato.

Il tempo di scollamento della membrana sinusale è stato simile nei due gruppi: è da sottolineare il fatto che la finestra di ridotte dimensioni non ha rappresentato un ostacolo alle manovre di scollamento. Nella valutazione di questi risultati devono però essere prese in considerazione alcune limitazioni: alcuni eventi, come ad esempio le perforazioni o le emorragie, oppure alcuni fattori anatomici quali la presenza dei setti ossei di Underwood, possono aver causato un prolungamento dei tempi chirurgici e aver determinato un'influenza sui dati.

La gestione di queste situazioni cliniche ha determinato una variazione dei tempi di trattamento e non è stato possibile quantificare il ritardo che ogni complicanza ha procurato.

Tuttavia, deve essere considerato il fatto che un approccio split-mouth garantisce le condizioni anatomiche più uniformi e che comunque il numero totale di queste complicanze è stato lo stesso nei due gruppi.

Dal questionario sul discomfort postchirurgico è emerso un risultato migliore per la procedura Test nelle prime fasi di guarigione, a 7, 14 e a 30 giorni dall'intervento. Di conseguenza, l'ipotesi nulla che non ci siano differenze in termini di discomfort per il paziente tra le due tecniche di preparazione della finestra di accesso deve essere rifiutata.

Si può considerare il fatto che una riduzione delle dimensioni della finestra potrebbe essere accompagnata da una riduzione delle dimensioni del lembo di accesso e che questa ulteriore minore invasività potrebbe portare ad un risultato ancora migliore in termini di discomfort postoperatorio, così come dimostrato dal recente lavoro riportato in precedenza (Nickenig et al. 2014). Questo potrebbe essere un interessante spunto di approfondimento per un'ulteriore ricerca clinica.

### **Conclusioni**

In conclusione, pur considerando i limiti di questo studio, i risultati di questa ricerca clinica randomizzata split-mouth possono essere riassunti in questo modo:

- 1 Una riduzione delle dimensioni della finestra di accesso al seno mascellare non mette a rischio la sicurezza dell'intervento di rialzo del seno mascellare. Le due procedure chirurgiche testate hanno ottenuto simili risultati in termini di altezza e spessore della cresta ossea ricostruita al controllo radiografico a 6 mesi.
- 2 Non ci sono state differenze statisticamente significative tra le due procedure riguardo alla durata del trattamento chirurgico, anche se la procedura Test si è dimostrata significativamente più veloce nei tempi parziali di aperture della finestra ossea e di riempimento del seno mascellare.
- 3 L'opinione dei pazienti a riguardo del discomfort postchirurgico ha mostrato una preferenza per la procedura Test nei controlli a 7, 14 e a 30 giorni dall'intervento.

### **Ringraziamenti**

*Gli Autori dichiarano di non avere conflitti di interesse. Questa ricerca è stata supportata da un contributo di Geistlich Biomaterials, Switzerland. Gli autori sono stati completamente indipendenti nella preparazione del protocollo, nella conduzione della ricerca, nell'interpretazione dei risultati e nella preparazione dell'articolo scientifico.*

### **Bibliografia**

- Barone A, Santini S, Marconcini S, Giacomelli L, Gherlone E, Covani U. Osteotomy and membrane elevation during the maxillary sinus augmentation procedure. A comparative study: piezoelectric device vs. conventional rotative instruments. Clin. Oral Impl. Res. 19, 2008; 511–515.
- Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. J Oral Surg 1980;38:613-616.
- Canullo L, Patacchia O, Sisti A, Heinemann F. Implant restoration 3 months after one stage sinus lift surgery in severely resorbed maxillae: 2-year results of a multicenter prospective clinical study. Clin Implant Dent Relat Res. 2012 Jun;14(3):412-20.
- Ferreira CE, Novaes AB, Haraszthy VI, Bittencourt M, Martinelli CB, Luczyszyn SM. A clinical study of 406 sinus augmentations with 100% anorganic bovine bone. J Periodontol. 2009 Dec;80(12):1920-7.
- Khoury, F. Augmentation of the sinus floor with mandibular bone block and simultaneous implantation: a 6-year clinical investigation. International Journal of Oral Maxillofacial Implants 1999; 14, 557–564.
- Jensen O, Shulman L, Block M, Lacono V. Report of the Sinus Consensus Conference of 1996. Int J Oral Maxillofac Implants 1998; 13:11–45.
- Johansson, B., Grepe, A., Wannfors, K., A ° Berg, P. & Hirsch, J.M. (2001a) Volumetry of simulated bone grafts in the edentulous maxilla by computed tomography: an experimental study. Dentomaxillofacial Radiology 30: 153–156.
- Johansson, B., Grepe, A., Wannfors, K. & Hirsch, J.M. (2001b) A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. Dentomaxillofacial Radiology 30: 157–161.

- Haas R, Baron M, Donath K, Zechner W, Watzek G. Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: a comparative histomorphometric study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 337-346.
- Lambert F, Lecloux G, Rompen E. One-Step Approach for Implant Placement and Subantral Bone Regeneration Using Bovine Hydroxyapatite: A 2- to 6-Year Follow-up Study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* Volume 25, Number 3, 2010: 598-606.
- Mish CE. *Contemporary Implant Dentistry* Mosby ST Louis 1993.
- Nickenig HJ, Wichmann M, Zoller JE, Eitner S. 3-D based minimally invasive one stage lateral sinus floor elevation. A prospective randomized clinical pilot study with blinded assessment of postoperative visible facial soft tissue volume changes. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2014; (42): 890-895.
- Pariente L, Dada K, Daas M. Mini-lateral windows for minimally invasive sinus augmentation: case series of a new technique. *Implant Dentistry* 2014;23(4): 371-77.
- Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):216-40.
- Schenk RK. Citodynamics and histodynamics of primary bone repair. In fracture healing. Lane J.M. Editor Churchill Livingstone, New York. 1987: 23-32.
- Schwarz-Arad D, Herzberg R, Dolev E. The prevalence of surgical complications of the sinus graft procedure and their impact on implant survival. *J Periodontol* 2004; 75: 511-516.
- Simonpieri A, Choukron J, Del Corso M, Sammartino G, Ehrenfest D. Simultaneous Sinus-Lift and Implantation Using Microthreaded Implants and Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin as Sole Grafting Material: A Six-Year Experience *Implant Dentistry* Volume 20 • Number 1:2-12.
- Tatum H Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am* 1986;30:207-229.
- Tarnow D, Wallace SS, Froum SJ, Rohrer MD, Cho SC. Histologic and clinical comparison of bilateral sinus floor elevations with and without barrier membrane placement in 12 patients: part 3 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20: 117-125.
- Testori T, Fumagalli L, Del Fabbro M, Francetti L, Weinstein R. Longitudinal prospective study of the survival of implants inserted simultaneously or delayed respect to sinus augmentation procedure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005.
- Testori T, Weinstein R, Wallace S. *La chirurgia del seno mascellare e le alternative terapeutiche*. Edizioni Acme Viterbo, Italy. 2005.
- Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Schenk R. Sinus graft with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: A 5-year study on 15 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20: 245-253.
- Van der Bergh JPA, Ten Bruggenkate CM, Dish FJM, Tuinzing DB. Anatomical aspects of sinus floor elevations. *Clin Oral Impl Res* 2000; 11: 256-265.
- Vercellotti T, De Paoli S, Nevins M. The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 561-567.
- Wallace SS, Froum SJ: Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants, A systematic review, *Ann Periodontology* 8:328-343, 2003.
- Wallace SS, Mazor Z, Froum SJ, Cho SC, Tarnow D. Schneiderian membrane perforation rate during sinus elevation using piezosurgery: clinical results of 100 consecutive cases. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2007; 27(5):413-19.
- Zitzmann N, and Schiirer P. Sinus elevation procedures in the resorbed posterior maxilla: Comparison of the crestal and lateral approaches. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998.

*Riferimento:*

Nicola Baldini, Viale Cialdini 4b, 50137, Firenze E-mail: baldini.nicola@gmail.com

## VALUTAZIONE DELLA PERCEZIONE SOGGETTIVA DEL PAZIENTE DOPO CHIRURGIA PARODONTALE RIGENERATIVA CON O SENZA INTRA-MARROW PENETRATION.

Vittorini Orgeas G.<sup>\*¶‡</sup>, Crea A.<sup>¶‡</sup>, Deli G.<sup>¶</sup>, Littarru C.<sup>¶‡</sup>, Capri D.<sup>‡</sup>, Lajolo C.<sup>¶‡</sup>, Zunino B.<sup>¶</sup>, Tatakis D. N.<sup>§</sup>

<sup>¶</sup> *Dip. di Parodontologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

<sup>‡</sup> *EduPeRIO, Viterbo*

<sup>§</sup> *Division of Periodontology, The Ohio State University, College of Dentistry, Columbus, Ohio, USA.*

### Riassunto

SCOPO: valutare la percezione del dolore post-operatorio e differenti patient-centered outcomes, in un RCT sul trattamento di difetti infraossei, mediante lembo d'accesso (OFD), con o senza perforazione della corticale ossea (IMP). MATERIALI E METODI: sono stati arruolati 41 pazienti affetti da parodontite cronica (CP) con almeno un difetto infraosseo  $\geq 3$ mm. Il trattamento chirurgico prevedeva OFD, gruppo ctrl, o OFD+IMP, gruppo test. I “patient-centered outcomes” (scala numerica verbale VNS, questionari OHIP-14 e Q-VNS) sono stati registrati durante il periodo di follow-up, fino ad 1 anno post-op. RISULTATI: statisticamente, tra test e ctrl. non sono risultate rilevanti le differenze dei valori medi di OHIP-14 totale, di VNS a 7, 14, 21 e 28 giorni ( $p > 0.05$ ). Il dolore post-operatorio influenza le attività quotidiane del paziente, con una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) dal 7° al 28° giorno post-operatorio, senza differenze statisticamente significative tra test e ctrl. CONCLUSIONI: la statistica indica come tra test e controllo, nei vari intervalli di tempo selezionati, non vi siano differenze significative, in nessuno degli ambiti indagati: la variabilità inter-gruppo non è tale da ritenere negativamente determinante l'adozione dell' IMP unitamente all' OFD nel trattamento chirurgico dei difetti infraossei. I risultati presentati, in accordo con i dati indicati dalle recenti pubblicazioni sull'argomento, potrebbero costituire una base per futuri RCT.

### INTRODUZIONE

Tradizionalmente, la ricerca scientifica in ambito parodontale si è preminentemente concentrata sugli aspetti clinici della parodontite ed in particolare sulla sua terapia, focalizzandosi sui risultati in termini di performance clinica. Più raramente essa ha preso in considerazione l'influenza della patologia e dei differenti approcci terapeutici sulla quotidianità del soggetto paziente, rappresentata principalmente dalla Oral Health-related Quality of Life (OHQoL). In accordo con la World Health Organization (WHO 2001), tale termine (OHQoL) indica la percezione della persona di come la salute orale influenzi la qualità di vita ed il globale benessere di un individuo (Ozelik et al. 2004).

Nel 2003, l'importanza dei patient-centered outcomes nella valutazione dell'efficacia dei trattamenti parodontali è stata indicata come area di interesse prioritario per la ricerca nel corso del World Workshop on Emerging Science in Periodontology (Tonetti et al. 2004).

Conseguentemente, in merito all'approccio evidence based della ricerca scientifica, è stata indicata l'importanza della distinzione tra endpoint veri e surrogati, incoraggiando i clinici a produrre un'inequivocabile evidenza riguardo ai potenziali effetti benefici per il paziente di un dato approccio terapeutico; da qui il suggerimento di adottare trials clinici, disegnati con endpoints veri che affianchino quelli surrogati, nell'identificare outcomes tangibilmente significativi per il paziente (Huyoe 2004).

Per concretizzare queste lacune del tradizionale approccio biomedico alla malattia ed alle relative condizioni di malessere del paziente, la ricerca parodontale è ricorsa a due strategie. Da un lato, l'impiego di questionari psicometrici qualitativi come l'Oral Health Impact Profile-14 (OHIP-14) (Slade 1997), che analizza specificatamente il dolore e le patologiche limitazioni funzionali, o come il General Oral Health Assessment Index (GOHAI, Atchison 1997), che enfatizza la valutazione di più articolati aspetti psicologico-comportamentali; dall'altro il ricorso a differenti test per misurare, in acuto, il dolore percepito sia in maniera

unidimensionale, come intensità algica (Visual Analogue Scale VAS, Numeric Rating Scale NRS, Visual Descriptor Scale VDS), sia in maniera multidimensionale, nei suoi aspetti relazionali, sensoriali e cognitivi.

In questo contesto, si inserisce il presente studio sperimentale, il cui obiettivo è stato valutare la percezione del dolore post-operatorio e differenti altri patient-centered outcomes in grado di influenzare la qualità della vita del paziente, registrati in seguito al trattamento chirurgico di difetti intraossei, mediante tecnica di lembo d'accesso (OFD), con o senza perforazione della corticale ossea (IMP) all'interno di un RCT multicentrico che ha validato l'efficacia clinica dell'associazione OFD+IMP (Crea et al., 2014).

## **MATERIALI E METODI**

### *Disegno dello studio*

Il design dello studio, come tutto l'approccio metodologico seguente, è stato descritto in un trial clinico randomizzato controllato (Crea et al. 2014), volto a testare l'effetto addizionale dell'IMP alla performance clinica dell'OFD nel trattamento dei difetti intraossei, confrontando un gruppo test (OFD+IMP) ed un gruppo controllo (OFD), accomunati da un accesso chirurgico al difetto, mediante lembi a preservazione di papilla (Cortellini et al. 1995, Cortellini et al. 1999) e differenti per l'impiego o meno della perforazione della corticale ossea (IMP).

I dati clinici e radiografici sono stati raccolti al baseline e a 12 mesi post-operatori.

I "patient-centered outcomes" sono stati registrati subito dopo la chirurgia e durante il periodo di follow-up, fino ad 1 anno post-op. La ricerca sperimentale è stata condotta in accordo con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, rivisitata nel 2000, e approvata dal comitato etico dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, sede di Roma, (Protocol P/176/CE/2009). Tutti i partecipanti hanno ricevuto completa spiegazione del protocollo in esame e degli scopi dello studio, fornendo il proprio consenso informato scritto.

I dati clinici e radiografici sono stati misurati da un unico operatore esperto, non coinvolto nelle precedenti fasi di pianificazione e non a conoscenza del tipo di trattamento e del timing di controllo realizzato.

I questionari sottoposti al paziente sono stati scelti per le caratteristiche di affidabilità e facile riproducibilità. Per la valutazione del dolore è stata utilizzata la scala numerica verbale (VNS del Q-VNS) mentre per la valutazione della OHQoL sono stati selezionati i questionari OHIP-14 e Q-VNS.

In particolare, questa trattazione analizza la morbidità postoperatoria, concentrandosi sulla pain perception e sull'impatto dei due trattamenti chirurgici sulla qualità di vita dei pazienti, correlando tali patient-centered outcomes ai risultati clinici della sperimentazione.

### *Popolazione*

I partecipanti sono stati reclutati tra i pazienti afferenti al Dipartimento di Parodontologia, dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, affetti da parodontite cronica (CP) di grado moderato o severo (Armitage GC, 1999).

In totale il gruppo selezionato include 20 uomini e 21 donne, tra i 36 e i 65 anni (età media  $52,3 \pm 6,9$  anni) arruolati tra il gennaio 2009 e l'ottobre 2010.

I criteri di inclusione ed esclusione sono stati riportati nel dettaglio nel precedente studio (Crea et al. 2014). In breve, sono stati selezionati pazienti con più di 28 anni di età, privi di patologie sistemiche influenzanti la salute parodontale e la guarigione delle ferite, o di allergie note a farmaci, non fumatori o fumatori (< 5 sigarette/die).

I pazienti che soddisfacevano i criteri di eleggibilità sono stati sottoposti a terapia eziologica parodontale (scaling e root planing, motivazione e istruzioni di igiene orale) e rivalutati a 8-12 settimane; solo coloro che rispettavano livelli residui di FMPS e FMBS  $\leq 20\%$  (O'Leary et al. 1972) sono stati ulteriormente selezionati per la valutazione delle caratteristiche dei difetti ossei.

I criteri di scelta del dente/difetto da trattare sono stati:

1. PPD  $\geq 5$ mm, CAL  $\geq 5$ mm in difetti a 2, 3 pareti o combinati, di profondità  $\geq 3$  mm;

2. assenza di interessamento delle forcazioni;
3. mobilità dentale  $\leq 1$ ;
4. assenza di segni di compromissione endodontica (denti vitali);
5. assenza di precontatti non-lavoranti;
6. assenza di segni di patologia cariosa in atto o pregressi restauri conservativi incongrui.

#### *Randomizzazione.*

I soggetti selezionati, sono stati assegnati ad uno dei due gruppi di trattamento, mediante randomizzazione a blocchi, con una ratio di 2:1, per massimizzare il numero di pazienti che avrebbero ricevuto il trattamento test; la tabella utilizzata per allocare i pazienti è stata formulata dallo statistico in osservanza di tali criteri.

#### *Parametri clinici e radiografici.*

La valutazione dei dati clinici e radiografici relativi al difetto selezionato e trattato in ciascun paziente, è stata eseguita manualmente, mediante sonda millimetrata, da un unico operatore in cieco, al baseline ed a distanza di 12 mesi dalla chirurgia parodontale.

La giunzione amelocementizia (CEJ) di ciascun dente è stata presa come riferimento per la registrazione, su sei siti per ciascun dente, dei seguenti parametri clinici: profondità di tasca (PPD), livello di attacco clinico (CAL), recessioni (REC), sanguinamento al sondaggio (BOP), indice di placca (PI), quantità di tessuto cheratinizzato (KTW).

Le informazioni radiografiche, pre e post operatorie, sono state estrapolate dall'analisi di radiografie endorali periapicali dei difetti, realizzate mediante tecnica del cono lungo. La profondità radiografica dei difetti (rDD) e la loro ampiezza (rDW) sono state entrambe valutate tramite strumento millimetrato e poi corrette, tenendo conto dell'ingrandimento radiografico stimato al 4% ed è stata inoltre registrata l'ampiezza radiografica dell'angolo del difetto (ANG) (Eickholz et al. 2004).

#### *Procedure chirurgiche.*

L'analisi dello svolgimento delle due procedure chirurgiche, per il gruppo test (OFD+IMP) e per il gruppo controllo (OFD), è stata precedentemente presentata in dettaglio (Crea et al. 2014).

#### *Protocollo post-operatorio.*

Al termine della procedura chirurgica, i pazienti hanno compilato il primo questionario OHIP-14 e ricevuto le istruzioni post-operatorie; al contempo il protocollo farmacologico prevedeva la somministrazione di antibiotico (1g di amoxicillina, 2 volte al giorno, per 6 giorni, a partire dalla mattina precedente all'intervento) e la prescrizione di un gel antisettico a contenuto di clorexidina 1%, da usare topicamente, 2 volte al giorno, per 3 settimane; veniva inoltre raccomandata l'assunzione di farmaci pain killer, ogni 12 ore, per almeno 3 giorni.

#### *Follow up (1°-4° settimana post-op).*

Dopo 7 giorni dalla chirurgia, sono state rimosse le suture e sono state stabilite le successive sedute di controllo con cadenza settimanale, durante il primo mese post operatorio, e trimestrale successivamente, per tutta la durata dello studio. Pertanto ad ogni appuntamento sono stati valutati tutti i parametri clinici rilevati al baseline e sono stati eseguiti polishing coronale e, se necessario, debridement sopragengivale e ripetizione delle istruzioni di igiene orale; in particolare a 7, 14, 21 e 28 giorni i soggetti selezionati hanno compilato il questionario Q-VNS, mentre l'OHIP-14 è stato ripetuto solamente a 7 e 28 giorni.

#### *Mantenimento (3-6-9-12 mesi post-op).*

A partire dal primo mese post-op, tutti i pazienti sono stati inseriti in un programma di mantenimento trimestrale che, in aggiunta a quanto eseguito in precedenza, prevedeva sia una seduta di scaling sotto gengivale a 9 e 12 mesi sia la rivalutazione dei valori di BOP e PI a 6 e 12 mesi. Inoltre, in particolare a 3, 6, e 12 mesi i pazienti hanno nuovamente compilato l'OHIP-14.

### **ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica dei questionari compilati dai pazienti è stata condotta a 12 mesi dall'intervento. La normalità delle variabili è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov. Le variabili continue (OHIP-14)



sono state analizzate mediante Ancova Test (valori medi) ed il confronto tra valori medi è stato realizzato mediante test di Bonferroni. Le variabili discontinue (VNS, abitudini) sono state analizzate mediante Chi-Quadro Test, ottenendo le tabelle di distribuzione dei valori dati. Ciascuna delle variabili discontinue è stata anche trattata come variabile continua. Il test esatto di Fisher (sig. esatta a 2 vie) è stato utilizzato per evidenziare la significatività statistica dei risultati. I grafici sono stati impostati basandosi sui valori medi (mean  $\pm$  SD) di ciascuna variabile nel tempo.

## RISULTATI

### OHIP-14.

Al baseline non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i valori medi di OHIP-14 totale nei due gruppi; a 7 giorni dalla chirurgia, tali medie totali diminuiscono per entrambi i gruppi, ma senza raggiungere la significatività statistica ( $p=0,638$ ); a 28 giorni dall'intervento, invece, la riduzione degli stessi valori medi di OHIP-14 totale, è statisticamente significativa ( $p=0,002$ ). Inoltre, per entrambi i gruppi, il valore medio OHIP-14 totale, valutato a 12 mesi dalla chirurgia rispetto al baseline, registra un cambiamento statisticamente significativo; al contrario, non risulta rilevante, da un punto di vista statistico, la differenza tra i valori medi di OHIP-14 totale, di gruppo test e controllo, in nessun intervallo del timing stabilito ( $p>0,05$ ).

Valori medi relativi a: limitazioni funzionali, impatto psicologico, dolore e disagio, impatto comportamentale e punteggio OHIP-14 totale, al baseline, a 7 giorni, 28 giorni, 3-6 e 12 mesi per entrambi i gruppi di trattamento.

	BASELINE	7 GIORNI	28 GIORNI	3 MESI	6 MESI	12 MESI	p**
<b>OHIP_14 TOTALE</b>							
gruppo OFD	9,5333	5,8000	2,2000	2,6667	1,4000	,8000	0,000
gruppo OFD + IMP	5,5000	4,0000	1,8846	2,2692	,8462	,6154	0,000
p*	0,95	0,130	0,635	0,479	0,334	0,639	
<b>LIMITAZIONI FUNZIONALI</b>							
gruppo OFD	,7000	,5333	,2333	,2333	,0667	,0667	0,001
gruppo OFD + IMP	,4423	,3269	,1731	,2500	,0769	,0385	0,000
p*	0,169	0,209	0,583	0,881	0,662	0,569	
<b>IMPATTO PSICOLOGICO</b>							
gruppo OFD	,6400	,5333	,0667	,0533	,0533	,0133	0,001
gruppo OFD + IMP	,2231	,3269	,0769	,0308	,0231	,0231	0,080
p*	0,092	0,530	0,906	0,456	0,352	0,623	
<b>DOLORE E DISCONFORT</b>							
gruppo OFD	1,6667	1,2667	,8333	,8000	,3667	,2000	0,000
gruppo OFD + IMP	1,3654	1,1538	,6346	,7885	,2500	,1923	0,000
p*	0,316	0,522	0,331	0,938	0,359	0,941	
<b>IMPATTO COMPORTAMENTALE</b>							
gruppo OFD	,3200	,1733	,0133	,0533	,0533	,0400	0,084
gruppo OFD + IMP	,0692	,0231	,0154	,0077	,0154	,0077	0,100
p*	0,079	0,018	0,906	0,170	0,272	0,187	

p\* = differenza statistica tra gruppi (controllo: OFD, test: OFD+IMP) al tempo indicato

p\*\* = differenza statistica nel tempo (da baseline a 12 mesi) per ciascun gruppo (controllo: OFD, test: OFD+IMP)

Nella tabella sopra i punteggi medi per l'OHIP-14 totale vengono affiancati da quelli isolati per singolo ambito indagato: limitazioni funzionali, impatto psicologico, dolore e disagio, impatto comportamentale; non si evidenziano, però, differenze rispetto all'andamento dei valori medi di OHIP-14 totale.

Il grafico seguente illustra la variazione dei punteggi medi di OHIP-14 totale nel tempo per i due gruppi OFD e OFD + IMP.

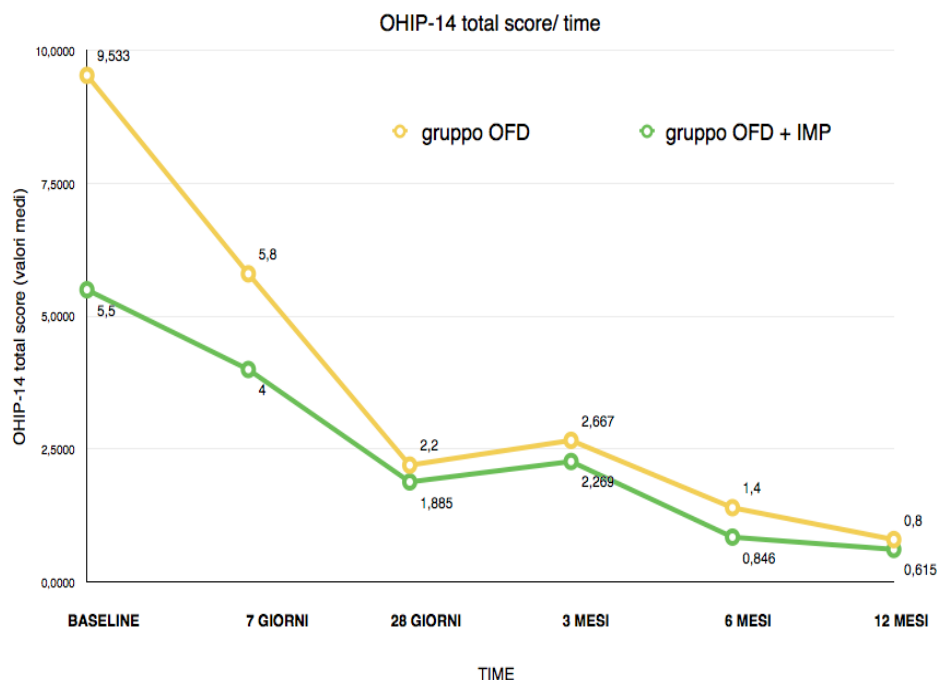


Tabella 1

BASELINE	9,5333	5,5000
7 GIORNI	5,8000	4,0000
28 GIORNI	2,2000	1,8846
3 MESI	2,6667	2,2692
6 MESI	1,4000	,8462
12 MESI	,8000	,6154

FIG.1 Cambiamenti del punteggio (medio) di Oral Health Impact Profile-14 (OHIP-14 ) nel tempo per ciascun gruppo (controllo: OFD, test: OFD+IMP)  
 $p > 0.05$  tra i due gruppi in ciascun tempo di registrazione.

## VNS

La distribuzione delle risposte su VNS a 7, 14, 21 e 28 giorni, relative alla percezione del dolore post operatorio è descritta dalle seguenti tavole di contingenza.

VNS - distribuzione delle risposte del gruppo OFD a 7, 14, 21, 28 giorni

GRUPPO OFD		TAVOLA DI CONTINGENZA												p*
		RISPOSTE												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
time	7-giorni	1	3	1	1	6	2	1	0	0	0	0		
	14-giorni	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	21-giorni	7	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	28-giorni	12	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
													,000°	

p\* = differenza statistica della distribuzione dei valori VNS nel tempo

C'è SIGNIFICATIVITA' STATISTICA TRA LE DISTRIBUZIONI NEL TEMPO - le diverse distribuzioni non sono casuali

VNS - distribuzione delle risposte del gruppo OFD + IMP a 7, 14, 21, 28 giorni

GRUPPO OFD + IMP														
TAVOLA DI CONTINGENZA		RISPOSTE												p*
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
time	7-giorni	1	5	3	4	8	5	0	0	0	0	0		
	14-giorni	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	21-giorni	14	9	1	2	0	0	0	0	0	0	0		
	28-giorni	20	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0		
													.000*	

p\* = differenza statistica della distribuzione dei valori VNS nel tempo

# VNS - distribuzione delle risposte di entrambi i gruppi a 7, 14, 21, 28 giorni

TAVOLA DI CONTINGENZA												
	RISPOSTE	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 p*
7 GIORNI												
gruppo OFD		1	3	1	1	6	2	1				
gruppo OFD + IMP		1	5	3	4	8	5					
p*												0,862
14 GIORNI												
gruppo OFD		15										
gruppo OFD + IMP		26										
p*												1
21 GIORNI												
gruppo OFD		7	8									
gruppo OFD + IMP		14	9	1	2							
p*												0,624
28 GIORNI												
gruppo OFD		12	2	1								
gruppo OFD + IMP		20	3	1	2							
p*												0,918

p\* = differenza statistica della distribuzione dei valori VNS tra gruppi (controllo: OFD, test: OFD+IMP) al tempo indicato  
NON C'è SIGNIFICATIVITA' TRA LE DISTRIBUZIONI VNS DEI GRUPPI NEI VARI TIMING

Confrontando le distribuzioni dei valori VNS dei due gruppi non sono emerse differenze statisticamente significative a 7, 14, 21 e 28 giorni ( $p > 0.05$ ).

Anche considerando i valori VNS come variabile continua, calcolando punteggi medi ( $\text{mean} \pm \text{DS}$ ), il confronto inter-gruppo, conferma l'assenza di significatività ( $p > 0,05$  a 7, 14, 21 e 28 giorni) precedentemente evidenziata dalle tavole di contingenza. In conclusione, il dolore post operatorio subisce un prevedibile, progressivo decremento nel corso del tempo e la relativa percezione non viene influenzata, in maniera statisticamente rilevante, dal tipo di trattamento chirurgico ricevuto al baseline, come evidenziato dal grafico sottostante.

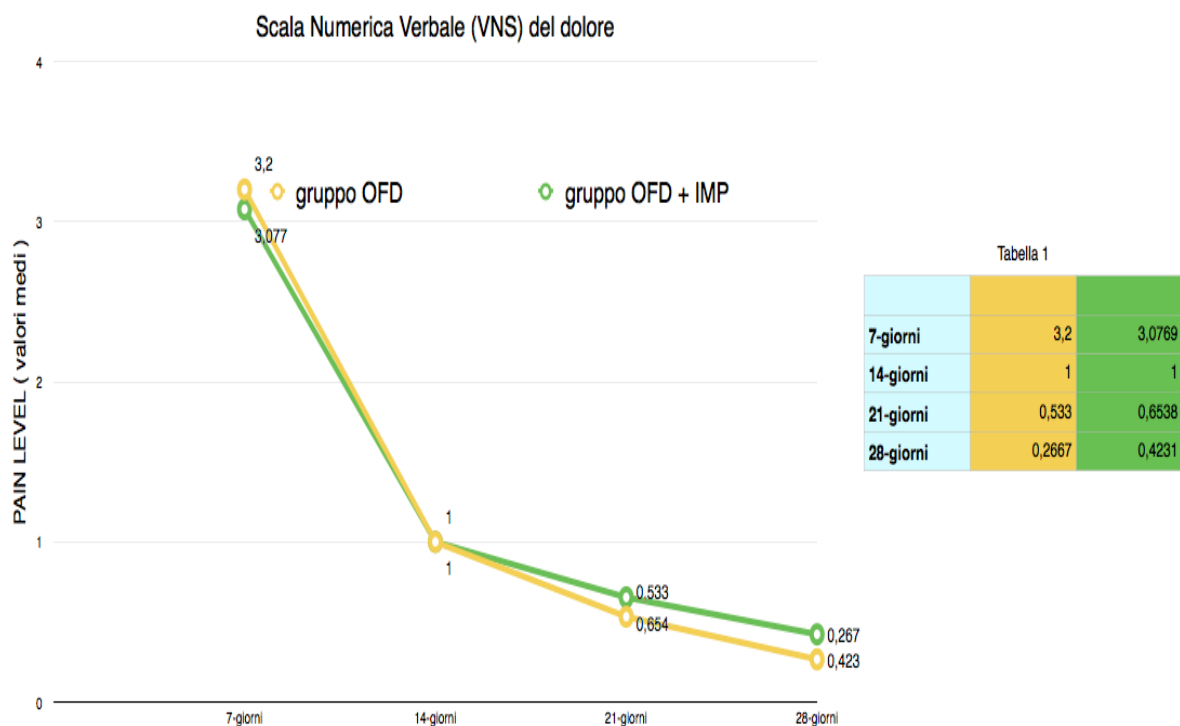


FIG.1 Evoluzione del dolore percepito dal paziente nel periodo post operatorio per ciascun gruppi  
(controllo: OFD, test: OFD+IMP)

$p > 0.05$  tra i due gruppi in ciascun tempo di registrazione.

### Attività quotidiane

L'influenza negativa del dolore post-operatorio, sulle attività svolte quotidianamente dal paziente, subisce una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ), dal 7° al 28° giorno post-operatorio, per entrambi i gruppi: evidentemente il tempo condiziona positivamente la percezione del dolore e la sua influenza sulla vita quotidiana e sulle abitudini dei pazienti. Però, il confronto dei gruppi OFD e OFD + IMP non ha mostrato differenze statisticamente significative in merito. La terapia chirurgica in generale, influenza inevitabilmente il dolore percepito dal paziente ed il relativo influsso sulle normali attività quotidiane, tuttavia tale interazione si manifesta indipendentemente dalla differente tecnica chirurgica eseguita.

Le tabella seguente illustra nel dettaglio tali dati.

INFLUENZA del DOLORE sulle ATTIVITA' quotidiane - distribuzione delle risposte di entrambi i gruppi a 7, 14, 21, 28 giorni

TAVOLA DI CONTINGENZA							
	RISPOSTE	0	1	2	3	4	5 p*
7 GIORNI							
gruppo OFD		1	9	5			
gruppo OFD + IMP		2	16	8			
p*							1
14 GIORNI							
gruppo OFD		10	2	3			
gruppo OFD + IMP		17	7	2			
p*							0,440
21 GIORNI							
gruppo OFD		7	7	1			
gruppo OFD + IMP		15	10	1			
p*							0,873
28 GIORNI							
gruppo OFD		12	2	1			
gruppo OFD + IMP		22	4				
p*							0,466
p* = differenza statistica della distribuzione dei valori assegnati all'influenza del dolore sulle attività quotidiane tra gruppi (controllo: OFD, test: OFD+IMP) al tempo indicato							
NON C'è SIGNIFICATIVITA' TRA LE DISTRIBUZIONI DOLORE/ ATTIVITA' DEI GRUPPI NEI VARI TIMING							

### Fumo

Il numero dei pazienti, fumatori e non fumatori, non è variato significativamente nel corso dello studio, in entrambi i gruppi.

Al baseline la distribuzione dei soggetti, fumatori e non, è omogenea e si mantiene tale durante il follow up dei casi.

### Farmaci pain-killers

Durante il follow-up post operatorio, il numero di pazienti che assume medicinali, FANS, diminuisce in maniera statisticamente significativa, nel tempo, in entrambi i gruppi. Il dato rilevante è che l'assunzione di farmaci non risulta influenzata dal tipo di terapia realizzata, come dimostra l'omogeneità del numero e durata di assunzioni nei differenti gruppi, nel tempo. A tal proposito è importante sottolineare come, nell'immediato postoperatorio (1 settimana post-op), 40 pazienti su 41 (97.6%) assumano FANS, 2 volte al dì, per un minimo di 1 giorno fino a 7gg. massimo (36 paz. ≤ 3gg., 4 paz. > 3gg.).

### Correlazioni fra variabili

E' stata valutata la correlazione tra i valori VNS, come variabile dipendente, e le variabili tempo, gruppo di randomizzazione, sesso, uso di farmaci e fumo. Il risultato della regressione multipla mostra che la "pain perception" è correlata, in maniera statisticamente significativa, solamente al tempo e ai farmaci.

## CONCLUSIONI

Dai primi anni 2000, si è assistito all'inizio di un cambiamento paradigmatico nella ricerca clinica in ambito parodontale; in seguito al World Workshop on Emerging Science in Periodontology nel 2003 ed alle conseguenti pubblicazioni (Tonetti et al. 2004, Hujoel 2004) è emersa la proposta di porre, nell'ambito dell'indagine scientifica in parodontologia clinica, una maggiore enfasi sull'importanza di considerare i cosiddetti patient-centred outcomes, nella valutazione delle differenti terapie parodontali in base alla loro efficacia. Storicamente infatti, in accordo con il tradizionale approccio biomedico al concetto di malattia, la ricerca sulla parodontite si è concentrata essenzialmente sui meccanismi fisiopatologici e sugli aspetti clinici del quadro nosocomiale, trascurando, in parte, l'impatto che la patologia e le relative terapie hanno sul paziente. Si deve invece assumere l'evidenza che la parodontite, in quanto malattia cronica, in associazione alle relative terapie, non ha solo effetti biologici, ma anche psicologici e sociali; pertanto la ricerca scientifica deve considerare e conoscere tali effetti al fine di modularli, disegnando un profilo di periodontal care che risponda anche alle principali richieste, necessità e preoccupazioni del paziente.

In tale scenario il nostro studio si è ispirato all'approccio biopsicosociale, come proposto da Hujoel (Hujoel 2004), secondo la definizione di Engel (Engel 1977), con lo scopo di affiancare all'oggettività della performance clinica di una tecnica chirurgica innovativa, la soggettività delle percezioni personali dei pazienti, relativamente all'impatto della terapia testata. La peculiarità della nostra ricerca sta nell'adozione simultanea di più tools: per l'analisi del dolore, una scala visuale ed un questionario a risposte aperte, quindi per le attività di vita quotidiana, domande con risposte multiple chiuse, il tutto integrato da un questionario OHIP-14; da sottolineare anche il timing dell'indagine che arriva fino a 12 mesi partendo dall'immediato postoperatorio e proseguendo settimanalmente per il primo mese: a nostra conoscenza il presente studio è il primo ad avere tali caratteristiche rispetto a quelli presenti in letteratura, per altro in numero esiguo.

In più i risultati presentati, sono in accordo con i dati indicati dalle più recenti pubblicazioni sull'argomento: insieme ad esse, sebbene di numero limitato, il presente lavoro si candida a costituire un'importante base della quale tener conto in futuri clinical trials.

Di particolare interesse è il grafico del OHIP-14 totale, il quale appare sovrapponibile a quello presentato da Ozcelik et al. 2007: anche se con valori medi migliori, l'andamento della curva test OFD + IMP mostra un'evoluzione simile a quella dei gruppi chirurgico (trattato mediante amelogenine) e non chirurgico dello studio citato; considerando l'assenza di differenze significative statisticamente nei patient-centered outcomes tra i due gruppi ed anche l'addizionale surplus in termini clinici fornito dall'IMP, forse questi risultati, uniti alla generale tendenza verso una migliore patient perception nel gruppo test, potrebbero ulteriormente supportare l'uso della corticotomia nei casi di difetti infraossei trattati con OFD.

In generale, la statistica indica chiaramente come tra i gruppi test e controllo, nei vari intervalli di tempo selezionati, non vi siano differenze significative, in nessuno degli ambiti indagati: la variabilità inter-gruppo non si presenta mai tale da ritenere negativamente determinante, anche solo minimamente, l'adozione dell'IMP. Al contrario, si evidenzia un ampio spettro di similitudini e di sovrapposizioni tra test e controllo, culminante, ad esempio, nell'identico andamento dei valori VAS decrescenti nel tempo, nella simile distribuzione delle risposte OHIP durante gli intervalli cronologici prescelti, nel sovrapponibile profilo relativo all'assunzione di farmaci pain-killers; talora, addirittura, possono essere estrapolate caratteristiche lievemente migliori, in favore del gruppo test. In generale i risultati della statistica permettono di ipotizzare che l'aggiunta della IMP alla tecnica chirurgica del lembo d'accesso, garantendo al contempo un surplus relativo alla performance clinica, non altera il vissuto del paziente in relazione alla esperienza algica e non modifica sostanzialmente la qualità di vita, né le abitudini quotidiane, rispetto a quanto accade nel solo OFD; inoltre si possono delineare presunte somiglianze con gruppi sperimentali di altri studi che prevedono l'uso di tecniche avanzate e modulatori biologici di riferimento.



## BIBLIOGRAFIA

1. WHO (2001) International Classification of Functioning, Disability and Health. WHO, Geneva.
2. Ozcelik, O., Haytac, M. C. & Seydaoglu, G. (2007) Immediate post-operative effects of different periodontal treatment modalities on oral health-related quality of life: a randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* 34, 788–796.
3. Tonetti, M. S., Fourmoussis, I., Suvan, J., Cortellini, P., Bragger, U. & Lang, N. P. European Research Group on Periodontology. (2004) Healing, post-operative morbidity and patient perception of outcomes following regenerative therapy of deep intrabony defects. *Journal of Clinical Periodontology* 31, 1092–1098.
4. Hujuel, P. P. (2004) Endpoints in periodontal trials: the need for an evidence-based research approach. *Periodontology* 2000 36, 196–204.
5. Slade, G. D. (1997) Derivation and validation of a short-form oral health impact profile. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 25, 284–290.
6. Atchison, K. (1997) The general oral health assessment index. In: Slade, G. (ed). *Measuring Oral Health and Quality of Life*, pp. 79–80. Chapel Hill: University of North Carolina, Dental Ecology.
7. Crea, A., Deli, G., Littarru, C., Lajolo, C., Orgeas, G. V., & Tatakis, D. N. (2014). Intrabony Defects, Open-Flap Debridement, and Decortication: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Periodontology*, 85(1), 34–42. <http://doi.org/10.1902/jop.2013.120753>
8. Cortellini, P., Pini Prato, G. & Tonetti, M. S. (1995) The modified papilla preservation technique. A new surgical approach for interproximal regenerative procedures. *Journal of Periodontology* 66, 261–266.
9. Cortellini, P., Pini Prato, G. & Tonetti, M. S. (1999) The simplified papilla preservation flap. A novel surgical approach for the management of soft tissues in regenerative procedures. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 19, 589–599.
10. Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* 4, 1–6.
11. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol* 1972;43:38.
12. Eickholtz P, Horr T, Klein F, Hassfeld S, Kim TS. Radiographic parameters for prognosis of periodontal healing of intrabony defects: two different definitions of defect depth. *J Periodontol* 2004;75:399-407.
13. Engel, G. L. (1977) The need for a new medical model: a challenge for biomedicine science. *Science* 196, 129–136.

Riferimento

Gianluca Vittorini Orgeas E-mail: Gianluca Vittorini Orgeas [giavitt@hotmail.com](mailto:giavitt@hotmail.com)

## VALORE PROGNOSTICO DI UN METODO SEMPLIFICATO PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO PARODONTALE: STUDIO RETROSPETTIVO IN UNA COORTE DI PAZIENTI IN TERAPIA PARODONTALE DI SUPPORTO

Luca Toselli<sup>1</sup>, Luigi Minenna<sup>1</sup>, Roberto Farina<sup>1,2</sup>, Antonio Zaetta<sup>1</sup>, Luigi Checchi<sup>3</sup>, Vittorio Checchi<sup>4</sup>, Michele Nieri<sup>5</sup>, Leonardo Trombelli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro Interdipartimentale di Ricerca per lo Studio delle Malattie Parodontali e Perimplantari, Università di Ferrara, Ferrara, Italia

<sup>2</sup> Unità Operativa di Odontoiatria, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara, Italia

<sup>3</sup> Dipartimento di Parodontologia ed Implantologia, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bologna, Italia

<sup>4</sup> Dipartimento di Biomedicina, Unità di Scienze Dentali e Biomateriali, Università di Trieste, Trieste, Italia

<sup>5</sup> Dipartimento di Chirurgia e Medicina Translazionale, Università di Firenze, Firenze, Italia

### Riassunto

**Obiettivo:** valutare se il punteggio di rischio generato con un metodo per la valutazione del rischio parodontale (UniFe, Trombelli et al. 2009) possa predire la progressione della parodontite durante la terapia di parodontale supporto (TPS). **Materiali & Metodi:** Sono stati ottenuti retrospettivamente i dati relativi a 109 pazienti inseriti in un programma di TPS per una media di  $5.6 \pm 2.2$  anni. I pazienti sono stati stratificati in base al punteggio di rischio (da 1-rischio basso a 5-rischio elevato) calcolato al completamento della terapia attiva, e confrontati per la perdita dentaria e le variazioni del livello osseo radiografico e della profondità di sondaggio (PD) durante la TPS.

**Risultati:** I pazienti con rischio 1, 2, 3, 4, 5 erano rispettivamente 5, 6, 20, 65 e 13. La media dei denti persi durante la TPS è variata da 0 a  $1.8 \pm 2.5$  per i pazienti con rischio 1 e 5, rispettivamente ( $p=0.041$ ). La perdita ossea media e l'aumento medio di PD durante la TPS erano entrambi  $\leq 0,50$  mm in tutti i gruppi, senza differenze significative tra gruppi. **Conclusioni:** La valutazione del rischio parodontale in accordo al metodo UniFe sembra aiutare ad identificare i pazienti trattati per parodontite che sono a rischio di perdere denti durante la TPS.

### INTRODUZIONE

La suscettibilità alla malattia parodontale varia da individuo a individuo in termini di incidenza e progressione spontanea della malattia parodontale quando quest'ultima non viene trattata (Løe et al. 1986, Trombelli et al. 2004a) e di risposta individuale al trattamento (Trombelli et al. 2004b). La natura di tale variabilità può essere attribuita in parte (nella misura del 50% circa) alla genetica (Michalowicz et al. 2000), mentre la rimanente parte è da attribuire a fattori di rischio individuati, almeno in parte, in studi longitudinali (Albandar. 2005, Heitz-Mayfield 2005). Anche i pazienti sottoposti a terapia parodontale attiva, inoltre, dimostrano un certo grado di variabilità nella progressione della malattia dopo trattamento (Rosling et al. 2001).

La valutazione del rischio è stata definita come il processo attraverso il quale vengono effettuate stime qualitative o quantitative sulla probabilità che un evento avverso ha di verificarsi come risultato dell'esposizione a specifici fattori di rischio (American Academy of Periodontology 2008). La valutazione dei determinanti del rischio in Parodontologia è fondamentale per l'identificazione precoce dei soggetti ad alto rischio e la formulazione di strategie preventive e terapeutiche personalizzate che consentano il controllo mirato dei fattori di rischio (Heitz-Mayfield 2005). La formulazione di giudizi soggettivi sul rischio parodontale genera valutazioni altamente variabili e può, quindi, risultare nella sottostima del reale livello di rischio o nella somministrazione di trattamenti inappropriati (Persson et al 2003). Negli ultimi anni, le osservazioni sulla ridotta accuratezza e consistenza della valutazione soggettiva del rischio hanno sostenuto il razionale per lo sviluppo di metodi oggettivi, al fine di ottenere informazioni più uniformi e accurate che possano ottimizzare il *decision-making* clinico, migliorare lo stato di salute orale dei pazienti e ridurre i costi della sanità (Tonetti et al. 2015).

Nelle ultime due decadi sono stati proposti diversi metodi per la valutazione del rischio, di cui solamente alcuni dispongono di dati longitudinali relativi alla associazione tra profili di rischio e progressione della malattia (Lang et al. 2015). In questo contesto, è stata dimostrata una correlazione significativa tra i punteggi di rischio generati attraverso il *Periodontal Assessment Tool* (PAT<sup>®</sup>; Previser Inc.) (Page et al. 2002, Page & Martin 2007) e la progressione della parodontite (valutata in termini di perdita dentaria e perdita di osso alveolare) in un campione di 523 soggetti in assenza di trattamenti parodontali per un periodo medio di 15 anni (Page et al. 2002, 2003). La letteratura scientifica, inoltre, sostiene l'utilità di questi metodi nel valutare la prognosi anche quando sono inseriti in un programma di terapia parodontale di supporto (TPS) (Matulienė et al. 2010). Pazienti inseriti in un programma di SPT e identificati come aventi un profilo di rischio elevato in accordo al *Periodontal Risk Assessment* (PRA) proposto da Lang & Tonetti (2003) hanno mostrato una perdita dentaria significativamente maggiore rispetto a pazienti con un profilo di rischio moderato o basso (Persson et al. 2003, Jansson & Norderyd 2008, Costa et al. 2012). La valutazione del rischio parodontale attraverso l'utilizzo di metodi standardizzati assume, quindi, un'importanza determinante sia in fase diagnostica che di impostazione della terapia parodontale attiva e di supporto (Tonetti et al. 2015).

Nel 2007 è stato introdotto un metodo semplificato (UniFe) per la valutazione del rischio parodontale (Farina et al. 2007, Trombelli et al. 2009). Il metodo è basato sulla valutazione di 5 parametri ricavati dall'anamnesi medica (stato di fumatore, stato diabetico), dalla cartella clinica (numero di siti con profondità di sondaggio  $\geq 5$  mm, indice di sanguinamento al sondaggio), o derivati (rapporto perdita ossea/età). In un'ampia coorte di pazienti è stata valutata la consistenza della valutazione prognostica effettuata in accordo al metodo UniFe rispetto a quella ottenuta attraverso l'applicazione del ben più complesso metodo PAT<sup>®</sup>. Per 107 pazienti selezionati casualmente presso un centro universitario specializzato nella diagnosi e nel trattamento delle malattie parodontali e peri-implantari sono stati calcolati i punteggi di rischio utilizzando entrambi i metodi. È stato osservato un sostanziale livello di accordo tra i due metodi, con una completa concordanza nel 74,8% dei casi (Trombelli et al. 2009). Ad oggi, tuttavia, non sono disponibili dati derivanti da studi clinici longitudinali sulla associazione tra i punteggi di rischio generati in accordo al metodo UniFe e l'incidenza o progressione della parodontite.

L'obiettivo del presente studio è quello di valutare, in una ampia coorte di pazienti arruolati in un programma di TPS, l'associazione tra livello di rischio calcolato in accordo al metodo UniFe e l'incidenza o progressione della parodontite.

## **MATERIALI E METODI**

### **Disegno sperimentale**

Lo studio è consistito nella valutazione retrospettiva di dati ottenuti dalle cartelle cliniche di pazienti in cura presso due centri specializzati nella diagnosi e nel trattamento delle malattie parodontali (Centro Interdipartimentale di Ricerca per lo Studio delle Malattie Parodontali e Peri-implantari, Università di Ferrara; Dipartimento di Parodontologia ed Implantologia, Università di Bologna).

La selezione dei pazienti è stata subordinata a specifici criteri di selezione (vedi "Popolazione di studio") e alla disponibilità dei dati clinici (vedi "Parametri sperimentali") relativi ai seguenti tempi di osservazione:

- T0 (visita iniziale): visita precedente (al massimo di 2 mesi) l'inizio della terapia parodontale attiva (non-chirurgica e/o chirurgica, in accordo al piano di trattamento del paziente; estrazione degli elementi dentari a prognosi infausta);
- T1 (*baseline*): rivalutazione del paziente effettuata entro 12 mesi dal completamento della terapia parodontale attiva;
- T2: rivalutazione del paziente effettuata a distanza di almeno 4 anni da T1.

## **Popolazione di studio**

I pazienti sono stati inclusi nella presente analisi se soddisfacevano tutti i seguenti criteri di inclusione, mentre sono stati esclusi se positivi per uno o più dei seguenti criteri di esclusione.

### *Criteri di inclusione*

- età  $\geq 18$  anni (al T0);
- 12 o più denti presenti per arcata (al T0);
- sottoposto/a a terapia parodontale attiva, consistita in una prima fase di terapia non chirurgica (sedute singole o multiple di strumentazione sopra e sotto gengivale in associazione o meno a terapia antibiotica) seguita (se indicato) da una o più sedute di chirurgia parodontale. Sono stati considerati eleggibili anche i pazienti sottoposti a chirurgia parodontale per motivi diversi dal trattamento della parodontite (es. correzione chirurgica di recessioni gengivali di origine traumatica);
- inseriti in un programma di TPS per almeno 4 anni, indipendentemente dal livello di compliance dimostrata con il programma;
- disponibilità dei dati relativi alla anamnesi medica e odontoiatrica, nonché della documentazione clinica e radiografica a T0, T1, e T2.

### *Criteri di esclusione*

- assunzione, per almeno un mese nell'intervallo tra T1 e il più recente tempo di osservazione disponibile, di farmaci con influenza documentata sulle condizioni dei tessuti parodontali o sui risultati della terapia parodontale, es. anticonvulsivanti (difenildantoina, fenitoina), antinfiammatori steroidei e non steroidei, antipertensivi (calcio antagonisti, nifedipina), immunosoppressori (ciclosporina), antibiotici, anticoagulanti, bifosfonati;
- presenza, durante il periodo dello studio, di una o più delle seguenti condizioni caratterizzate da una influenza documentata sullo stato parodontale e/o i risultati della terapia parodontale: gravidanza, malattie genetiche (es. sindrome di Down), malattie del sistema immunitario (es. HIV), malattie ematologiche con deficit qualitativo e quantitativo dei leucociti, disabilità fisiche e mentali che interferiscono con le adeguate manovre di igiene domiciliare.

## **Parametri sperimentali**

### *Dati anamnestici*

I seguenti dati anamnestici (riferiti a T0) sono stati ricavati dalle cartelle cliniche:

- data di nascita;
- sesso;
- razza (caucasica, non-caucasica);
- stato di fumatore (fumatore, ex fumatore, mai fumato);
- numero di sigarette consumate al giorno;
- stato diabetico (diabetico, non diabetico);
- controllo metabolico del diabete (livello sierico di HbA1c).

A T1 e T2 sono state registrate eventuali variazioni nello stato di fumatore, nel numero di sigarette fumate al giorno, nello stato diabetico e nel controllo metabolico del diabete.

### *Terapia parodontale*

Per ciascun paziente sono state ricavate le seguenti informazioni relative alle terapie parodontali pregresse;

- numero di sedute di strumentazione parodontale non-chirurgica effettuate durante la terapia attiva (ovvero tra T0 e T1);
- numero di sedute di chirurgia parodontale effettuate durante la terapia attiva (ovvero tra T0 e T1);
- frequenza delle sedute di TPS suggerita al termine della terapia attiva (T1);
- numero delle sedute di TPS alle quali il paziente si è sottoposto tra T1 e i tempi di osservazione

successivi;

- numero di sedute di terapia chirurgica alle quali il paziente è stato sottoposto tra T1 e i tempi di osservazione successivi.

#### *Parametri clinici*

I seguenti parametri sono stati ricavati dalle cartelle cliniche per ciascun tempo di osservazione:

- numero di denti naturali presenti;
- profondità di sondaggio (PD): distanza in mm tra il margine gengivale e il fondo della tasca; registrata su sei aspetti (mesio-buccale, buccale, disto-buccale, mesio-linguale, linguale, disto-linguale) di ogni dente;
- sanguinamento al sondaggio (BOP): registrato come positivo quando il sanguinamento gengivale era presente entro 10 secondi dall'inserimento della sonda durante la valutazione di PD.

#### *Parametri radiografici*

Sul completo radiografico periapicale eseguito a ciascun paziente a T0, T1 e T2, un operatore calibrato ha effettuato le misurazioni radiografiche. La rilevazione delle misurazioni relative ai pazienti inclusi nello studio è stata preceduta da una sessione di calibrazione. Tale sessione è stata condotta su radiografie di pazienti non inclusi nello studio, fino al raggiungimento della affidabilità intra-operatore ( $K \text{ score} \geq 0.70$ ).

A ciascun tempo di osservazione, sull'aspetto mesiale e distale di ciascun dente presente è stata misurata la distanza (in mm) dalla giunzione amelo-cementizia alla cresta alveolare (CEJ-BC). Nei siti in cui la CEJ non poteva essere identificata a causa della presenza di restauri conservativi o protesici, è stata misurata la distanza tra il margine cervicale del restauro e la cresta alveolare. Sono stati esclusi dall'analisi i siti nei quali non era possibile valutare radiograficamente la posizione della CEJ, del margine del restauro o della cresta alveolare.

#### **Valutazione del rischio parodontale**

A ciascun tempo di osservazione, il livello di rischio di ciascun paziente è stato valutato in accordo al metodo UniFe, come proposto da Farina et al. (2007) e modificato da Trombelli et al (2009).

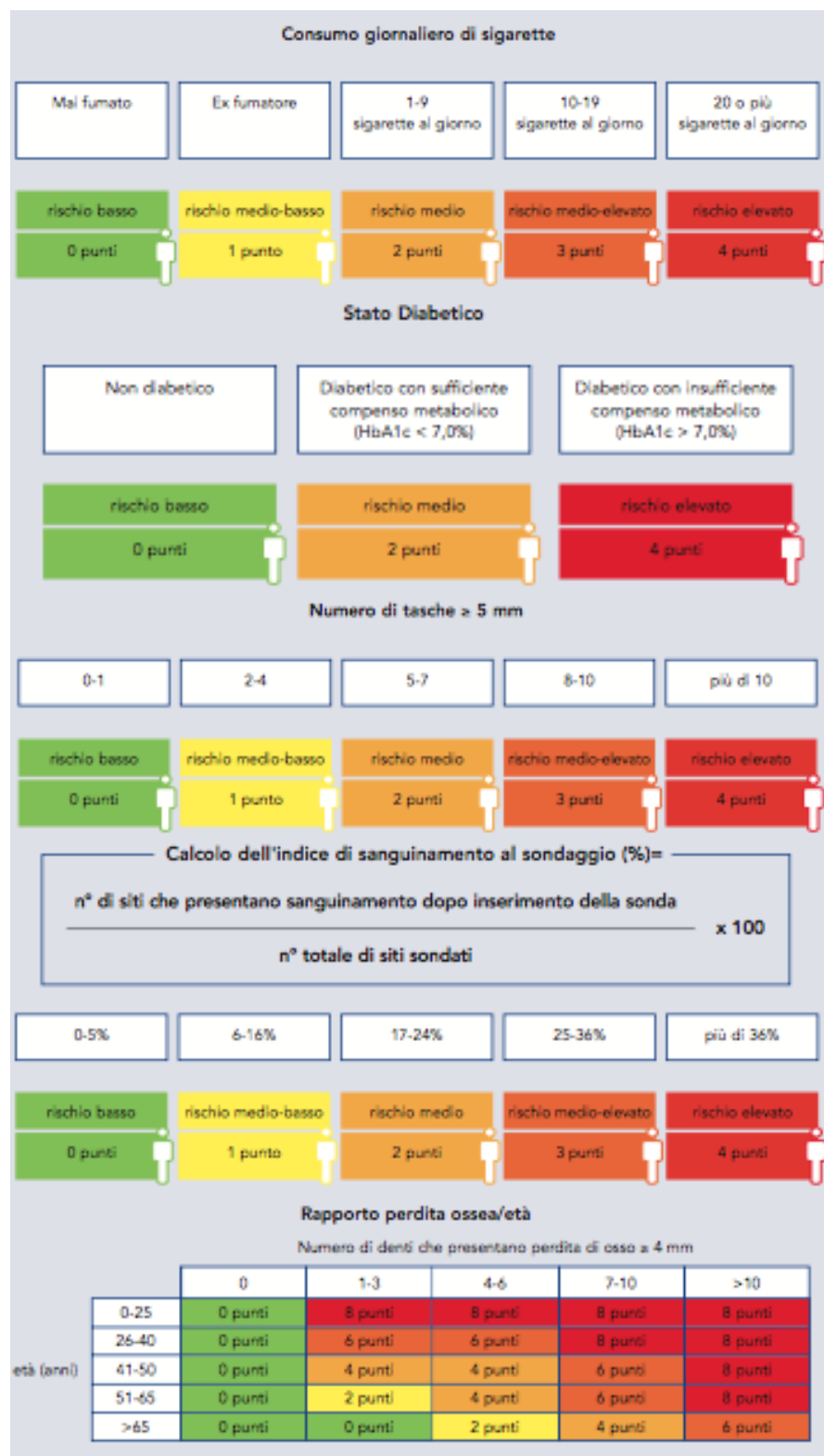
La valutazione del rischio secondo UniFe è basata su 5 parametri ottenuti dall'anamnesi medica del paziente e da misurazioni cliniche. I parametri UniFe sono i seguenti (Figura 1):

- fumo: registrato come "non-fumatore", "ex-fumatore" o "fumatore". Per i fumatori, veniva registrato il consumo giornaliero di sigarette;
- diabete mellito (sono stati considerati sia tipo 1 che tipo 2): registrato come "non-diabetico", "diabetico in controllo metabolico" (ovvero con una concentrazione sierica di emoglobina glicosilata  $< 7.0\%$  all'ultimo esame), "diabetico in insufficiente controllo metabolico" (ovvero con una concentrazione sierica di emoglobina glicosilata  $\geq 7.0\%$  all'ultimo esame);
- numero di siti con profondità di sondaggio  $\geq 5$  mm: la profondità di sondaggio è stata misurata dal margine gengivale al fondo della tasca. Le misurazioni sono state effettuate con una sonda a pressione manuale (CP 12; Hu-Friedy, Chicago, Illinois, USA), con una forza di circa 0.3 N, in 6 siti per ciascun dente (mesio-vestibolare, vestibolare, disto-vestibolare, mesio-linguale, linguale, disto-linguale). Il numero di siti con profondità di sondaggio  $\geq 5$  mm è stato contato per ciascun paziente;
- sanguinamento al sondaggio (BoP): ciascun sito sondato è stato registrato come positivo quando veniva identificato sanguinamento gengivale durante o dopo l'inserimento della sonda. BoP è stato calcolato come la percentuale di siti positivi in rapporto al numero totale di siti sondati;
- rapporto perdita ossea/età: la perdita ossea è stata registrata sulle radiografie peri-apicali come il numero di denti con una distanza dalla giunzione amelo-cementizia alla cresta ossea  $\geq 4$  mm su almeno un versante interprossimale (mesiale o distale). L'età è stata espressa in anni. Una speciale tabella è stata creata arbitrariamente per incrociare l'età del paziente con la severità della perdita ossea.

Ciascun parametro ha ricevuto un punteggio ("punteggio del parametro"), come illustrato nella Figura 1. La somma algebrica dei punteggi dei parametri è stata calcolata e inquadrata in una

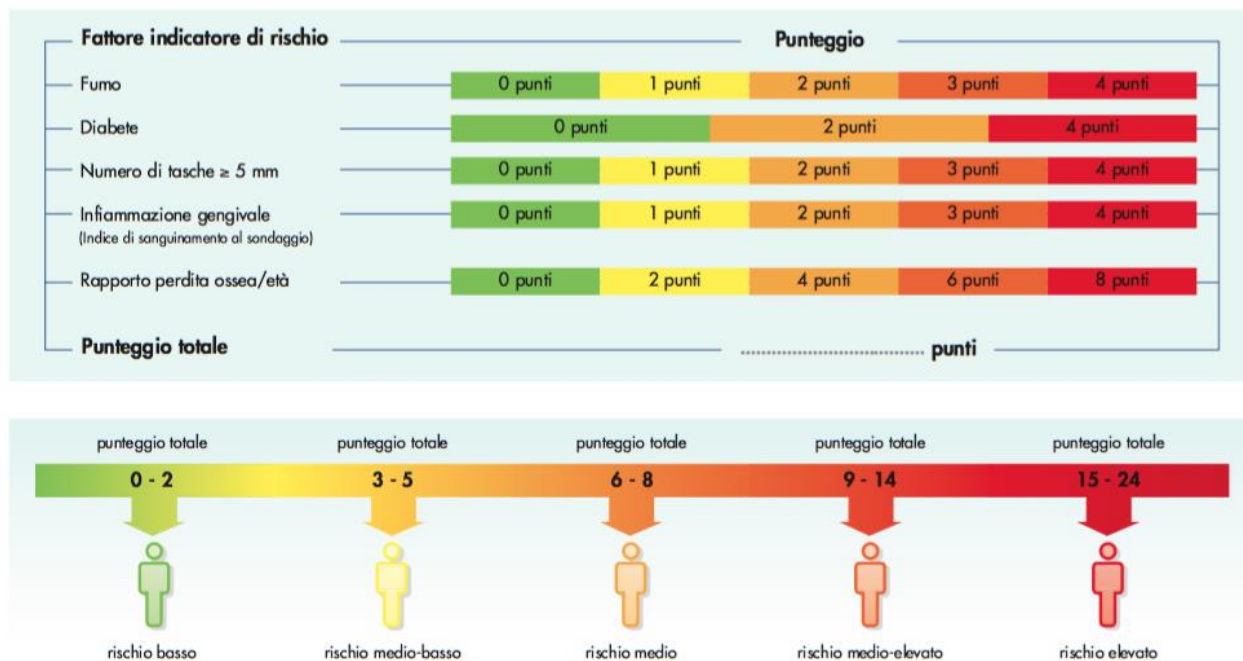
“classe di rischio”: 1 (rischio basso), 2 (rischio medio-basso), 3 (rischio medio), 4 (rischio medio-elevato), e 5 (rischio elevato) (Figura 2).

**Figura 1.** Tabelle di assegnazione dei punteggi di rischio per ciascun parametro del metodo UniFe





**Figura 2.** Tabella di calcolo del livello di rischio in accordo al metodo UniFe.



### Analisi statistica

Il paziente è stato considerato come unità statistica. Per ciascun paziente, sono state calcolati i seguenti parametri derivati:

- numero di denti persi tra T1 e T2;
- valore medio (espresso in mm) delle variazioni del livello radiografico della cresta ossea osservate tra T1 e T2 ( $CEJ-BC_{loss}$ );
- prevalenza (espressa in %) dei siti con  $CEJ-BC_{loss} \geq 2$  mm tra T1 e T2 ( $\%loss*year$ );
- valore medio delle variazioni di PD osservate tra T1 e T2.

I confronti tra gruppi di pazienti con diverso livello di rischio sono stati effettuati mediante analisi della varianza (ANOVA). I confronti post-hoc sono stati effettuati con test di Tukey –Kramer o test  $\chi^2$ . Il livello di significatività statistica è stato fissato a  $p < 0.05$ .

E' stata, inoltre, eseguita una regressione *stepwise forward* utilizzando come variabile risposta  $\%loss*year$  e come variabili predittive i seguenti parametri (utilizzando T1 come riferimento per la loro valutazione): sesso, età, stato di fumatore e numero di sigarette/die, numero di denti presenti, numero di siti con  $PD \geq 5$  mm, prevalenza (%) dei siti BoP-positivi, numero di denti con  $CEJ-BC \geq 4$  mm, valore medio di  $CEJ-BC$  (mm), PD media (mm). Analogamente, è stata condotta anche una regressione *stepwise backward*.

## RISULTATI

### Popolazione di studio

Centonove pazienti (42 maschi e 67 femmine; età media:  $42.2 \pm 10.2$  anni, range 22-62) sono stati inclusi nel presente studio.

Settantadue pazienti non avevano mai fumato, 5 erano ex fumatori e 32 erano fumatori (di cui 8 pazienti fumavano 1-9 sigarette/die, 20 pazienti fumavano 10-19 sigarette/die, e 4 pazienti fumavano  $\geq 20$  sigarette/die). Sei pazienti erano affetti da diabete, 4 dei quali presentavano diabete non compensato ( $HbA1c \geq 7\%$ ) mentre gli altri 2 avevano un sufficiente compenso metabolico ( $HbA1c < 7\%$ ).

La terapia attiva è consistita in una media di  $5.4 \pm 2.9$  sedute di strumentazione parodontale non-chirurgica, seguita da una media di  $2.9 \pm 1.7$  (range: 0-7) sedute di chirurgia parodontale. Sono stati perduti in totale 122 denti tra T0 e T1, con una media di  $1,1 \pm 1,5$  (range 0-7).

Al termine della terapia attiva (T1), la PD media era di  $2.71 \pm 0.38$  mm (range 1.66-3.91). I pazienti presentavano mediamente  $7.6 \pm 8.8$  siti (range: 0-63) con  $PD \geq 5$  mm. Ventidue pazienti avevano 0-1 siti con  $PD \geq 5$ mm, 26 pazienti avevano 2-4 siti, 26 pazienti ne avevano 5-7, 9 pazienti ne avevano 8-10, 26 pazienti ne avevano più di 10. La prevalenza del BoP era di  $7.1 \pm 10.4\%$  (range 0-55). Il numero medio di siti con  $CEJ-BC \geq 4$  mm era di  $11.2 \pm 7.6$  (range 0-28).

La durata media della TPS (T2) è stata di  $5.6 \pm 2.2$  anni (range 15-6). Durante la TPS, i pazienti sono stati sottoposti, mediamente, a  $13.8 \pm 6.3$  (range 0-33) sedute di strumentazione non-chirurgica, con una frequenza media di una seduta ogni  $3.4 \pm 1.1$  mesi. Ventinove pazienti (26%) hanno necessitato di uno o più interventi chirurgici durante la TPS.

### Livello di rischio parodontale

I punteggi per le classificazioni nelle diverse categorie di rischio al T0, T1, T2 in accordo con UniFe sono schematizzati nella Tabella 1.

A T0, il 96% dei pazienti era caratterizzato da un livello di rischio di 4 o 5. Sebbene la terapia parodontale attiva abbia determinato una drastica riduzione della prevalenza dei pazienti con rischio 5, il 68% dei pazienti mostrava, a T1, un livello di rischio di 3 o 4. Al termine della TPS, la distribuzione dei pazienti in accordo al livello di rischio e il livello di rischio medio non hanno mostrato variazioni significative rispetto a T1 (Tabella 1).

**Tabella 1.** Distribuzione dei pazienti in accordo al punteggio di rischio assegnato mediante il metodo UniFe alla prima visita (T0), entro 12 mesi dal completamento della terapia attiva (T1), a distanza di almeno 4 anni da T1 (T2).

Punteggio di rischio UniFe	T0 N (%)	T1 N (%)	T2 N (%)
1	2 (2)	5 (4)	6 (6)
2	0 (0)	6 (6)	7 (6)
3	3 (3)	20 (18)	20 (19)
4	30 (27)	65 (60)	55 (50)
5	74 (68)	13 (12)	21 (19)
<b>Media</b>	4.6	3.7	3.7
<b>SD</b>	0.7	0.9	1.0
<b>Mediana</b>	5	4	4
<b>Intervallo Interquartile</b>	4; 5	3; 4	3; 4

### Associazione tra punteggi di rischio UniFe e progressione della parodontite durante la TPS

#### Perdita dentaria

Tra T1 e T2, 45 (41%) pazienti hanno perso, complessivamente, 93 denti, con una media di  $0.9 \pm 1.5$  denti persi per paziente. Per ciascun anno di SPT, i pazienti hanno perso 15,9 denti, con una media di  $0.15 \pm 0.26$  denti per paziente.

La perdita dentaria durante la TPS nei pazienti stratificati per livello di rischio al completamento della terapia attiva (T1) è riportata in Tabella 2. Il numero totale medio di denti perduti da ciascun paziente durante la TPS è variato da 0 per i pazienti caratterizzati da un livello di rischio di 1 a  $1.8 \pm 2.5$  denti per i pazienti con un livello di rischio di 5, con una differenza statisticamente significativa tra i pazienti con rischio 3 e i pazienti con rischio 5 ( $p= 0.041$ ). Il numero medio di denti perduti per anno da ciascun paziente durante la TPS è variato da 0 per i pazienti caratterizzati da un livello di rischio di 1 a  $0.32 \pm 0.51$  denti per i pazienti con un livello di rischio di 5, con una differenza statisticamente borderline i gruppi di pazienti con diverso livello di rischio a T1 ( $p= 0.05$ ) (Tabella 2).

**Tabella 2.** Numero di denti persi (espresso come media e SD) durante la TPS nei pazienti stratificati per livello di rischio al completamento della terapia attiva (T1).

Punteggio di rischio UniFe a T1	N	n° denti persi	n° denti persi per anno di TPS
1	5	0 (0)	0 (0)
2	6	0.8 (1.2)	0.17 (0.27)
3	20	0.3 (0.6)	0.07 (0.12)
4	65	0.9 (1.4)	0.14 (0.21)
5	13	1.8 (2.5)	0.32 (0.51)
<b>p value</b> (ANOVA o $\chi^2$ Tukey-Kramer)		0.0407 (R3 $\neq$ R5)	0.0527

*Livello radiograficamente determinato della cresta ossea*

Tra T1 e T2, il livello radiograficamente determinato della cresta ossea ha mostrato una variazione ( $CEJ-BC_{loss}$ ) media di  $0.14 \pm 0.64$  mm, con un min [-1.31; 4.14].

I valori di  $CEJ-BC_{loss}$  nei pazienti stratificati per livello di rischio al completamento della terapia attiva (T1) sono riportati in Tabella 3. Il valore medio di  $CEJ-BC_{loss}$  è stato inferiore a 0.50 mm indipendentemente dal livello di rischio, senza differenze statisticamente significative tra i gruppi (Tabella 3)

**Tabella 3.** Perdita ossea radiografica ( $CEJ-BC_{loss}$ , espresso come media e SD) durante la TPS nei pazienti stratificati per livello di rischio al completamento della terapia attiva (T1).

Punteggio di rischio UniFe a T1	N	CEJBCLossT1T2
1	5	0.37 (0.64)
2	6	0.40 (0.48)
3	20	0.14 (0.44)
4	65	0.09 (0.75)
5	13	0.17 (0.30)
<b>p value</b> ANOVA o $\chi^2$ Tukey-Kramer		0.7529

*Profondità di sondaggio*

Durante la TPS, la PD ha mostrato una variazione da un aumento di 1.74 mm a una riduzione di 0.65 mm, con un aumento medio di  $0.30 \pm 0.49$  mm.

La variazione della PD durante la TPS nei pazienti stratificati per livello di rischio al completamento della terapia attiva (T1) è riportata in Tabella 4. Indipendentemente dal livello di rischio a T1, la variazione media di PD durante la TPS è stata inferiore a 0.50 mm. Nessuna differenza statisticamente significativa nella variazione di PD è stata osservata tra i gruppi (Tabella 4).

**Tabella 4.** Aumento della profondità di sondaggio (PD) (espressa come media e SD) durante la TPS nei pazienti stratificati per livello di rischio al completamento della terapia attiva (T1).

Punteggio di rischio UniFe a T1	N	Aumento (mm) medio in PD tra T1 e T2
1	5	0.50 (0.68)
2	6	0.42 (0.46)
3	20	0.16 (0.32)
4	65	0.31 (0.52)
5	13	0.36 (0.53)
p-value ANOVA o $\chi^2$ Tukey-Kramer		0.5289

**Valore prognostico dei parametri del metodo UniFe**

L'analisi di regressione *stepwise backward* incorporava, come uniche variabili statisticamente significative relative al T1, il numero di sigarette/die ( $p=0.030$ ) e il numero di siti con  $PD \geq 5$  mm ( $p=0.012$ ). Il modello era caratterizzato da un valore di  $R^2$  di 0.12.

**CONCLUSIONI**

In conclusione, i risultati del presente studio sembrano indicare che la valutazione del rischio in accordo al metodo UniFe (Farina et al. 2007, Trombelli et al. 2009) può aiutare ad identificare i pazienti a rischio di perdere denti durante la terapia parodontale di supporto. Il valore prognostico del metodo UniFe in corso di terapia parodontale di supporto, tuttavia, deve essere ulteriormente valutato in studi prospettici a lungo termine condotti su ampie coorti di pazienti con diverso profilo prognostico al termine della terapia attiva.

## BIBLIOGRAFIA

- Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005;49:517-32, v-vi
- American Academy of Periodontology. American Academy of Periodontology statement on risk assessment. *J Periodontol* 2008; 79: 202.
- Costa FO, Cota LO, Lages EJ, Lima Oliveira AP, Cortelli SC, Cortelli JR, Lorentz TC, Costa JE. Periodontal risk assessment model in a sample of regular and irregular compliers under maintenance therapy: a 3-year prospective study. *J Periodontol* 2012;83:292–300.
- Farina R, Minenna L, Trombelli L. Nuova Metodica di Valutazione del Rischio in Parodontologia: razionale e applicazione clinica. *Dental Cadmos* 2007;3:19-42.
- Heitz-Mayfield LJA. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl. 6):196–209.
- Jansson H & Norderyd O. Evaluation of a periodontal risk assessment model in subjects with severe periodontitis. A 5-year retrospective study. *Swed Dent J* 2008;32:1–7.
- Lang NP, Tonetti MS. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Health Prev Dent* 2003;1:7–16.
- Lang NP, Suvan JE, Tonetti MS. Risk factor assessment tools for the prevention of periodontitis progression a systematic review. *J Clin Periodontol* 2015; 42 (Suppl. 16):S59–S70.
- Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986;13:431-445.
- Matuliene G, Studer R, Lang NP, Schmidlin K, Pjetursson BE, Salvi GE, Bragger U, Zwahlen M. Significance of Periodontal Risk Assessment on the recurrence of periodontitis and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2010;37:191–199.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:1699–1707.
- Page RC, Krall EA, Martin J, Mancil L, Garcia RI. Validity and accuracy of a risk calculator in predicting periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 2002;133:569–576.
- Page RC, Martin J, Krall EA, Mancil L, Garcia RI. Longitudinal validation of a risk calculator for periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2003;9:819–827.
- Page R, Martin JA. Quantification of periodontal risk and disease severity and extent using the Oral Health Information Suite (OHIS). *PERIO* 2007;4:163-180.
- Persson GR, Mancil L, Martin J, Page RC. Assessment of risk for periodontal disease by expert clinicians relative to assessment using a computerized risk assessment tool. *J Am Dent Assoc* 2003;134:575–582.
- Rosling B, Serino G, Hellstrom M-K, Socransky SS, Lindhe J. Longitudinal periodontal tissue alterations during supportive therapy. Findings from subjects with normal and high susceptibility to periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001;28:241–249.
- Tonetti MS, Eickholz P, Loos BG, Papapanou P, van der Velden U, Armitage G, Bouchard P, Deinzer R, Dietrich T, Hughes F, Kocher T, Lang NP, Lopez R, Needleman I, Newton T, Nibali L, Pretzl B, Ramseier C, Sanz-Sanchez I, Schlagenhauf U, Suvan JE, Fabrikant E, Fundak A. Principles in prevention of periodontal diseases—Consensus report of group 1 of the 11th European workshop on periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2015;42 (Suppl. 16):S5–S11.
- Trombelli L, Farina R, Ferrari S, Pasetti P, Calura G. Comparison Between Two Methods for Periodontal Risk Assessment. *Minerva Stomatol* 2009;58:277-287.
- Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S, Orlandini E, Tosi M. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of "high-responder" and "low-responder" subjects. *J Clin Periodontol* 2004a;31:239-252.
- Trombelli L, Scapoli C, Orlandini E, Tosi M, Bottega S, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. III. Response of "high responders" and "low responders" to therapy. *J Clin Periodontol* 2004b;31:253-259.

Riferimento:

Luca Toselli e-mail: [lucatoselli@hotmail.it](mailto:lucatoselli@hotmail.it)

## VALIDAZIONE DI TECNICHE DI IMAGE PROCESSING PER L'ANALISI VOLUMETRICA DELL'ALVEOLO POST-ESTRATTIVO IN PAZIENTI AFFETTI DA PARODONTITE SEVERA

Valeria Manavella\*, Federica Garrone°, Federica Romano\*, Cristina Bignardi°, Mario Aimetti\*

\* Dipartimento di Scienze Chirurgiche, C.I.R. Dental School, Sezione di Parodontologia, Università di Torino (Italia)

° Dipartimento di Ingegneria Meccanica ed Aerospaziale, Politecnico di Torino (Italia)

### Riassunto

**Introduzione:** Obiettivo dello studio è validare una nuova tecnica di indagine volumetrica che combini l'analisi CBCT (Cone Beam Computed Tomography) con metodiche d'image-processing per ottenere la ricostruzione tridimensionale di immagini dalla geometria complessa, quali le cavità alveolari con riassorbimento delle pareti, ed il loro calcolo volumetrico. Attualmente, sono presenti in letteratura solo lavori che valutano la precisione di misure lineari ottenute da CBCT.

**Materiali e metodi:** E' stata eseguita l'elaborazione digitale con tecniche di segmentazione manuale e automatica di 9 alveoli di denti estratti per motivi parodontali mediante due software per elaborazione di immagini, Mimics e ImageJ che, preso come riferimento, è ampiamente utilizzato in letteratura. Le procedure d'image-processing sono state validate eseguendo segmentazione e rendering di marker sferici a volume noto. L'applicabilità del metodo su geometrie complesse è stata testata su un modello a volume noto, ottenuto dal fresaggio delle immagini CBCT di un alveolo con la parete vestibolare riassorbita e scansionato con MicroCT.

**Risultati:** Mediante implementazione delle funzioni del software Mimics è possibile ricostruire immagini complesse non finite e, grazie ad un errore pari all'1.5% e alla ripetibilità delle misurazioni anche da parte di operatori con differenti livelli di esperienza, acquisire dati volumetrici affidabili. **Conclusioni:** Queste informazioni potrebbero trovare applicazione nella progettazione di scaffold self-made.

### Introduzione

La tomografia computerizzata a fascio conico (CBCT) è diventata, negli ultimi anni, uno strumento diagnostico molto diffuso con svariate applicazioni in ambito odontoiatrico. Grazie alla rapidità dell'acquisizione dell'immagine volumetrica, ottenuta da un'unica scansione a basso voltaggio e bassa dose irradiante, la dose efficace necessaria si è drasticamente ridotta rispetto ad altri metodi di imaging CT (computer tomography) e rientra nel range di dosaggio delle altre analisi radiografiche tradizionalmente utilizzate in odontoiatria<sup>1</sup>. Tuttavia, la precisione delle misurazioni tridimensionali eseguite su immagini CBCT non è ancora stata determinata<sup>2-3</sup>.

Questa tipologia di immagine contiene numerose distorsioni e svariati gradi di errore dovuti alla acquisizione dell'immagine mediante tecnologia CBCT, alla sua elaborazione, al tipo di software e, quindi, all'algoritmo utilizzato per estrapolare i dati dalle immagini.

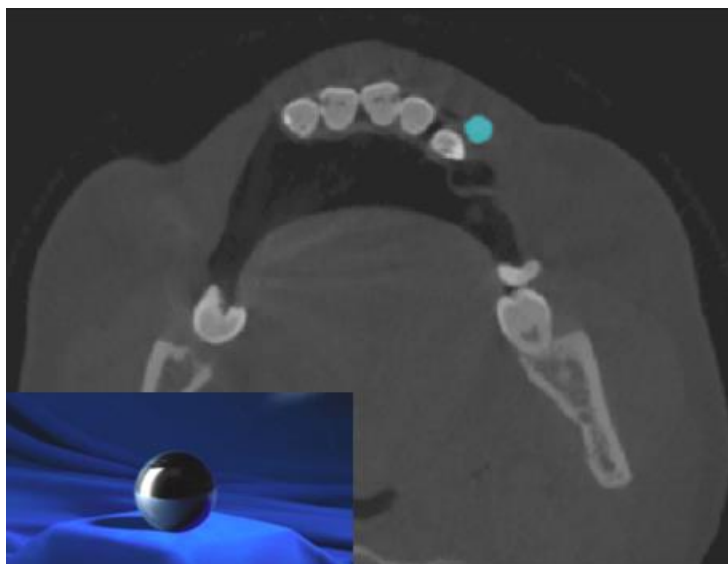
Solo pochi lavori in letteratura si sono incentrati sulla verifica della correttezza delle misurazioni ottenute dalle immagini CBCT. La maggior parte dei dati deriva dalla validazione di nuovi metodi di analisi cefalometrica utili nel campo dell'ortodonzia<sup>4</sup>. Altri lavori hanno testato la precisione delle ricostruzioni tridimensionali per la prototipazione di manufatti in chirurgia maxillo-facciale<sup>5-7</sup>. Questi studi riportano dati sulla precisione di misure lineari, mentre nessun lavoro ha valutato la possibilità di estrapolare dati volumetrici da ricostruzioni 3D e sulla loro precisione. Per quanto riguarda l'applicazione in ambito parodontale non esiste nessuna metodica validata utile a determinare il grado di riassorbimento alveolare.

Pertanto, l'obiettivo di questo studio è stato validare una metodica di calcolo volumetrico e di ricostruzione tridimensionale di anatomie complesse su immagini CBCT e di valutarne la precisione.

### Materiali e metodi

Sono stati selezionati in modo consecutivo 9 pazienti affetti da parodontite cronica generalizzata che necessitavano dell'estrazione di almeno un elemento dentale per motivi parodontali. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a terapia parodontale non chirurgica raggiungendo livelli adeguati d'igiene orale domiciliare e controllo dei parametri infiammatori. Dopo approvazione del protocollo di ricerca da parte del Comitato Etico ed acquisizione del consenso informato, i pazienti sono stati sottoposti alle estrazioni ed immediatamente ad analisi CBCT eseguita mediante l'ausilio di una brega munita di marker radiopachi in alluminio (sfere ad alta precisione, diametro 5 mm, volume 65.5 mm<sup>3</sup>, Martin & C. S.r.l., Italia) (Figura.1).





**Figura 1:** Sfera ad alta precisione in alluminio (5 mm di diametro, volume 65.5 mm<sup>3</sup>) usata come marker radiopaco e sua segmentazione con tecnica automatica su software Mimics

Le immagini acquisite con CBCT (New Tom/ NTVG; field of view = 153.60 mm; slice thickness = 0.4 mm; pixel size = 0.3mm; tube voltage = 110kV; maximum current = 2mA; scan time = 10s) sono state convertite in formato DICOM e importate all'interno dei software Mimics 17.0 (Mimics® Innovation Suite, Materialise NV, Belgium) e ImageJ (National Institute of Health, USA) per essere elaborate con procedure d'immagine processing. Il software ImageJ è ampiamente utilizzato nella letteratura odontoiatrica e, come tale, considerato in questo studio come riferimento.

#### ***Elaborazione delle immagini con Mimics 17.0***

##### **Marker**

La validazione delle procedure d'immagine processing e l'implementazione dei volumi sono state testate sulla segmentazione dei marker radiopachi in alluminio a volume noto. Dai data-set acquisiti sono state isolate le immagini di CBCT raffiguranti i singoli marker in alluminio, queste ultime sono state elaborate mediante procedure di segmentazione, manuale e automatica, implementabili con il software Mimics 17.0. L'indagine si è limitata alle immagini d'interesse riducendo le dimensioni del file da gestire. Lo stack di immagini selezionate sono state settate per l'analisi con le funzioni di: aumento del contrasto e di filtraggio passa-basso così da accedere alle operazioni di Thresholding e di segmentazione.

La tecnica di Thresholding, alla base di entrambe le metodiche di segmentazione utilizzate (manuale e automatica), consente di classificare tutti i pixel, compresi in un range in unità hounsfield (HU), come appartenenti a una determinata maschera da cui sarà possibile individuare ed estrarre l'oggetto d'interesse. Infatti, nelle immagini in esame è possibile notare come, per valori soglia maggiori o uguali a 360 HU, si possano etichettare in una singola maschera tutti i pixel appartenenti a tessuto osseo alveolare, denti e marker, mentre per valori inferiori, quelli relativi a tessuti molli e sfondo dell'immagine tomografica.

**Segmentazione manuale:** la maschera ottenuta dalla sogliatura è stata limitata per ciascuna slice esclusivamente alla regione di interesse (ROI), avendo cura di ricostruire manualmente l'intero profilo del marker (Figura 1).

**Segmentazione automatica:** Sfruttando il tool di Thresholding sono state selezionate ed evidenziate le 2 maschere di interesse così da separare i tessuti duri e i marker dai tessuti molli e dallo sfondo. Con l'operazione Booleana Sottrattiva si è ridotto il campo di lavoro alle porzioni di slice raffiguranti i marker sulle quali è stato possibile svolgere l'implementazione dell'algoritmo di Region Growing Segmentation identificando, in modo rapido e iterativo, tutti i pixel omogenei per intensità e connessi tra loro all'interno del marker. A differenza della sola operazione di Thresholding, la tecnica di Region Growing consente di individuare la ROI attraverso un concetto di accrescimento, capace di ricercare tutti i pixel che rispondono non solo a un criterio di omogeneità, ma anche di connessione spaziale.

**Rendering delle immagini:** a seguito della segmentazione delle immagini di interesse per ogni singola slice, è possibile procedere al Rendering, necessario per la ricostruzione 3D dell'immagine e per la valutazione del

suo volume. E' possibile usufruire della funzione Calculate 3D che permette la realizzazione di un modello tridimensionale uniforme e accurato partendo dai dati 2D precedentemente elaborati.

Tutte le procedure sono state implementate per la segmentazione di 8 marker, tutti sufficientemente distanti dai tessuti duri (osseo alveolare e dentale) e le misure ottenute sono state raccolte in un foglio di calcolo Excel.

### ***Cavità alveolari***

A seguito della validazione delle procedure sopra descritte su immagini finite e semplici come quelle raffiguranti i marker è stato possibile utilizzare lo stesso protocollo per implementare la valutazione del volume delle cavità alveolari post-estrattive. Sono state selezionate manualmente le immagini di ciascuno stack raffiguranti l'intera cavità alveolare. Per far fronte all'incertezza dell'immagine dovuta alla distruzione del tessuto duro e alla demineralizzazione del sito si è fatto riferimento ai picchi ossei residui ed agli apici radicolari adiacenti per identificare le aree di interesse.

Tutte le serie di slice sono state trattate con le operazioni di pre-processing. Ogni singolo stack di immagini ottenuto è stato segmentato mediante le due tecniche previste (manuale e automatica) e sviluppato con il Rendering. I volumi ottenuti (Figura 2) sono stati raccolti in un database. Nella segmentazione automatica è necessario intervenire su ogni slice dello stack per determinare manualmente la chiusura dell'immagine seguendo l'andamento della parete mucosa residua grazie alla differente visualizzazione dei tessuti, resa possibile dal Thresholding dell'immagine svolto nelle prime fasi del procedimento.

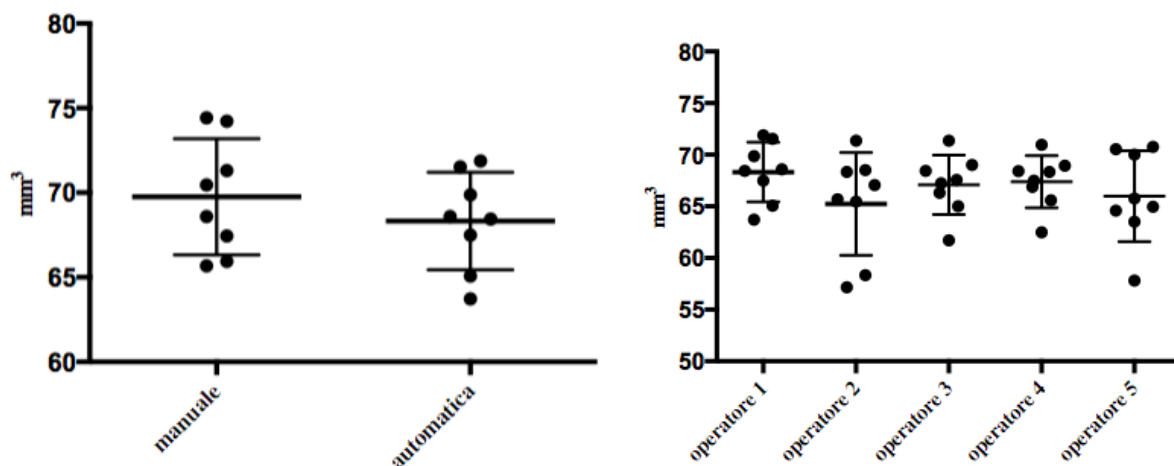


Figura 2: Analisi grafica delle differenze tra le tecniche di segmentazione manuale e automatica degli 8 markers (sinistra) e confronto inter-operatore della tecnica di segmentazione automatica (destra). Il grafico evidenzia la dispersione delle singole misure intorno alla media. Le due linee più esterne rappresentano il primo ed il terzo quartile

Al fine di valutare la variabilità inter e intra-operatore di ciascuna tecnica, tali procedure sono state ripetute 5 volte per ogni alveolo da 5 operatori differenti (di cui 2 non esperti).

### ***Elaborazione delle immagini con ImageJ***

Per validare l'attendibilità della metodica ottenuta con il software Mimics e testare la variabilità introdotta dagli algoritmi di segmentazione sulle tecniche automatiche, gli stack di immagini sono stati elaborati con un secondo software open-source, molto utilizzato nella letteratura scientifica, basato su Sun-Java e sviluppato dal National Institute of Health degli USA (ImageJ), che ha permesso di calcolare il volume alveolare sulla base delle dimensioni dei pixel contenuti nella ROI. Dopo un trattamento di pre-processing tramite operazioni di Enhance contrast e di Smoothing, le immagini sono state opportunamente sogliate per individuare la ROI rispetto allo sfondo. Risultato di tale procedura è uno stack di immagini binarie in cui i tessuti duri sono rappresentati da pixel bianchi, mentre i tessuti molli e lo sfondo da pixel neri.

Le pareti alveolari mancanti sono state riprodotte con un Tool di disegno a mano libera. È stato possibile procedere con la segmentazione e con la valutazione dell'area sottesa dai pixel neri che rappresentano la

cavità alveolare. Per ottenere l'informazione volumetrica, questi valori sono stati sommati e moltiplicati per lo spessore delle slice.

### **Verifica sperimentale**

Poiché il volume degli alveoli non era noto a priori, per validare il metodo, le stesse procedure d'immagine processing sono state ripetute per l'elaborazione di immagini di MicroCT (Sky scan 1174v2, risoluzione: 11.4  $\mu\text{m}$ , tempo di esposizione per ogni angolazione: 2400 ms, angolazione: 0.3°, Bruker, Belgio) relative a un modello realizzato in cloruro di polivinile (PVC) di uno degli alveoli analizzati. Partendo dalla ricostruzione 3D di uno degli alveoli analizzati, è stato possibile ricavare il file .STL (formato per interfaccia per stereoliteografia), necessario per il successivo processo di prototipazione rapida sottrattiva, realizzato con la fresatrice a controllo numerico Roland MDX-40 SRP® (Roland DG Mid Europe S.R.L, Italia). In questo modo, il modello ottenuto dal rapid prototyping è in grado di emulare, con una buona precisione (0.002 mm/step), la geometria di un alveolo dentale di volume noto perché ottenuto dal file STL ricavato dall'elaborazione delle immagini CBCT.

### **Analisi dei dati**

Sulla base dei risultati del test di normalità Shapiro-Wilk sono stati eseguiti test ANOVA a una via per confrontare l'analisi volumetrica mediante i tre metodi presi in esame, considerando come ipotesi nulla l'assenza di differenza tra le metodiche e utilizzando test post-hoc (t-test di Bonferroni) per indagare le differenze inter-gruppo. Per la validazione inter-operatore è stato utilizzata l'ANOVA per misure ripetute ponendo come ipotesi nulla l'assenza di differenza tra gli operatori.

Per valutare l'errore medio di ogni metodo di analisi si sono confrontati i volumi calcolati con le due metodiche rispetto ai volumi noti del marker radiopaco e del modello in PVC di un alveolo mediante il t-test per dati appaiati. Si è considerato statisticamente significativo un p-value < 0.05. L'analisi statistica è stata eseguita con il programma statistico Graphpad Prism6.

### **Risultati**

Tutte le immagini sono state sogliate ottenendo valori medi di sogliatura sovrapponibili tra tutti gli operatori. Si è identificata in 360 HU la soglia minima per ottenere la risoluzione ottimale per evidenziare tessuti duri, ossei e dentali.

Le procedure di segmentazione automatica e manuale dei marker radiopachi con forma sferica e volume noto di 65.5 mm<sup>3</sup> hanno restituito un volume medio di 69.76  $\pm$  3.43 mm<sup>3</sup> (6.50%) per la tecnica manuale e di 68.325  $\pm$  2.87 mm<sup>3</sup> (4.32%) per quella automatica, con un errore standard rispettivamente di 1.21 mm<sup>3</sup> e 1.01 mm<sup>3</sup> (Tabella 1).

Marker	Manuale (mm <sup>3</sup> )	Automatica (mm <sup>3</sup> )
CD 4 Marker 1	70.46	67.49
CD 4 Marker 2	65.95	63.72
CD 4 Marker 3	71.31	69.87
CD 5 Marker 1	74.22	71.53
CD 5 Marker 2	74.43	71.88
CD 5 Marker 3	67.44	68.44
CD 6 Marker 1	68.60	68.60
CD 6 Marker 2	65.68	65.07
Volume reale	65.5 mm <sup>3</sup>	
Media (mm <sup>3</sup> )	69.76	68.33
Dev. St. (mm <sup>3</sup> )	3.43	2.88
Errore Standard (mm <sup>3</sup> )	1.21	0.96
Indice di errore	0.02	0.02

**Tabella 1: Analisi volumetrica con segmentazione manuale e automatica su software Mimics di 8 marker radiopachi con uguale geometria e volume noto**

La differenza tra le due procedure è statisticamente significativa a favore della tecnica automatica Mimics (p=0.025) che ha dimostrato anche una maggiore ripetibilità inter-operatore (p=0.49) ed una precisione di misura di  $\pm 0.6$  mm<sup>3</sup> (Figura 2).

Sono stati analizzati i volumi di 9 alveoli post-estrattivi di pazienti affetti da parodontite cronica generalizzata. Il volume medio degli alveoli in esame era di 169.590  $\pm$  76.108 mm<sup>3</sup>. L'analisi della varianza

(Figura 3) ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra le tre metodiche di analisi volumetrica ( $p < 0,0001$ ).

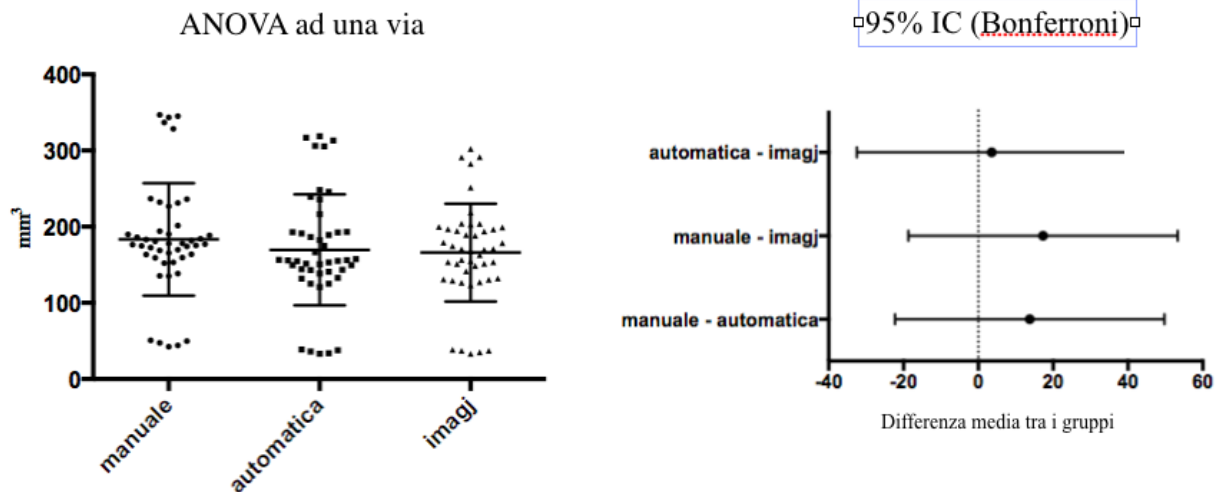


Figura 3: Analisi grafica delle misurazioni eseguite con tecniche di segmentazione manuale e automatica con software Mimics e segmentazione con software ImageJ (sinistra) e delle loro differenze medie con l'intervallo di confidenza al 95% (destra)

In particolare, la differenza maggiore è emersa dal confronto tra la tecnica manuale e quella automatica mediante Mimics ( $p=0.0068$ ) che ha restituito in media volumi maggiori di  $13.75 \text{ mm}^3$  rispetto a quella automatica (Figura 4). Non sono, invece, emerse differenze statisticamente significative tra le due tecniche automatiche (Mimics e ImageJ).

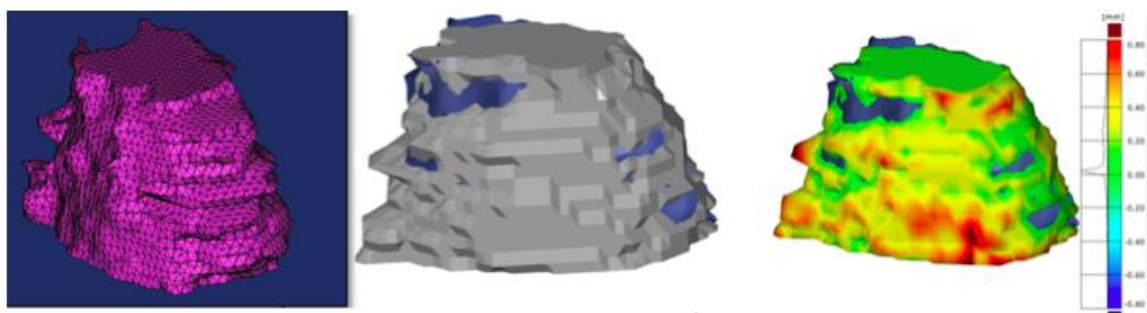


Figura 4: Confronto tra la tecnica di segmentazione manuale e quella automatica implementate con Mimics. Evidenza grafica del sovra-riconoscimento della tecnica manuale (colore grigio) rispetto a quella automatica (colore blu). Differenza quantificabile anche tramite la scala colore relativa alla distanza in mm tra i due modelli. Inoltre, per quanto riguarda la ripetibilità inter-operatore legata alla tecnica automatica implementata con Mimics non sono emerse differenze statisticamente significative ( $p=0.086$ ) cosa che farebbe supporre un'applicazione semplice e intuitiva di tale procedura (Figura 5).

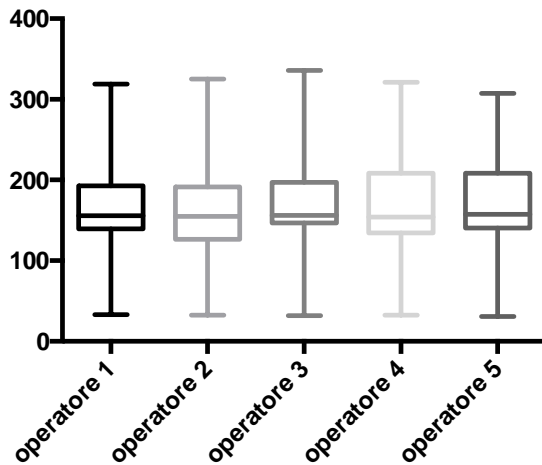


Figura 5: Box-plot che evidenzia l'assenza di differenza statisticamente significative tra le segmentazioni effettuate da 5 diversi operatori utilizzando la tecnica automatica su software Mimics

Infine, la scansione con Micro CT del prototipo in PVC di uno degli alveoli dentali in esame ha restituito un volume pari a  $317.05 \text{ mm}^3$  che differisce di  $19.4 \text{ mm}^3$  rispetto a quello del file STL utilizzato nella fase iniziale del processo di prototipazione rapida sottrattiva (Figura 6).

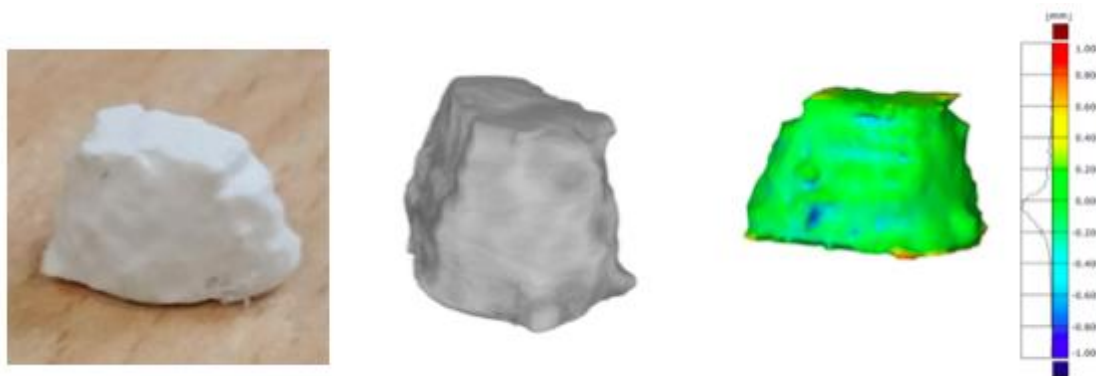


Figura 6: Prototipo, modello di un alveolo dentale fresato in PVC. Relativa scansione con MicroCT e sovrapposizione tra il modello ricostruito con tecnica automatica e quello ottenuto dalla segmentazione di immagini di MicroCT. L'immagine evidenzia l'incapacità della fresatrice a controllo numerico di apprezzare alcuni dettagli come sottosquadri e rientranze

Tale risultato è legato alla lavorazione, incapace di apprezzare alcuni dettagli come sottosquadri e rientranze, caratteristici del file fornito in ingresso alla fresatrice a controllo numerico. Una volta preso come riferimento il volume ottenuto dalla scansione della MicroCT, le prove di segmentazione automatica e manuale, eseguite con il software Mimics sulle immagini di MicroCT, hanno restituito valori poco distanti dal volume noto. Il software ImageJ ha estrapolato un dato volumetrico sovrapponibile al volume noto. Se utilizziamo il volume noto, ottenuto dalla prototipazione rapida, per il confronto con il volume medio ottenuto dalle 5 prove per alveolo per ognuno dei tre software in esame, per il software Mimics l'errore percentuale è di 1.5% per la tecnica automatica e del 7% per la tecnica manuale, mentre l'utilizzo di ImageJ determina un errore del 10%. La precisione di misura per la tecnica automatica utilizzando Mimics è di  $\pm 0.44 \text{ mm}^3$ .



## Discussione

Scopo di questo studio è proporre un metodo di analisi quantitativa per misurare l'entità di riassorbimento osseo alveolare, in particolare nei casi affetti da forme avanzate di parodontite, attraverso l'implementazione di tecniche d'immagine processing in software nati per il disegno 3D. Per testare l'applicabilità e l'accuratezza di queste tecniche sono state condotte prove di segmentazione sulle immagini raffiguranti marker radiopachi a volume noto. La segmentazione automatica e manuale delle sfere ha restituito volumi simili tra loro. Tale risultato è legato alla geometria e alla posizione dei marker che risultano facilmente riconoscibili, poiché sufficientemente distanti dai denti e dalle strutture anatomiche con simili tonalità di grigio. La morfologia dei marker riveste un ruolo rilevante nella precisione di segmentazione richiedendo un minore sforzo interpretativo da parte dell'operatore che è così facilitato nella procedura di segmentazione manuale.

Altro fattore importante evidenziato dalla segmentazione dei marker è la risoluzione dello stack e, in particolare, la distanza tra una slice e l'altra. Infatti, immagini con spessore di 0.4 mm impediscono il completo riconoscimento dei marker sferici con dimensioni di pochi mm che così appaiono privi delle estremità. L'indice di errore del 4.32% della tecnica automatica di Mimics è paragonabile agli indici di errore presenti in letteratura sulla validazione di misurazioni lineari su immagini CBCT<sup>8</sup>. Questo dato ci conferma la precisione delle ricostruzioni utilizzando software validati e ci sottolinea come l'errore sia intrinseco nelle immagini CBCT<sup>5-9</sup> e come la correttezza della segmentazione delle immagini influenzi drammaticamente il risultato finale dell'elaborazione del file .STL<sup>10</sup>.

Una volta eseguite le prove sui marker, le stesse procedure d'immagine-processing sono state implementate per la segmentazione delle cavità alveolari in esame, in modo da verificare l'efficacia del metodo sulla geometria di strutture anatomiche di reale interesse clinico. Mettendo a confronto le due tecniche, sebbene la procedura di segmentazione manuale si sia rilevata semplice e intuitiva, ha evidenziato alcune criticità. Oltre al tempo necessario per l'elaborazione delle singole immagini, le sue maggiori criticità consistono nell'elevata variabilità introdotta dalla ricostruzione manuale di tutte le pareti alveolari, intatte o danneggiate, e nel problema del sovra-riconoscimento da parte dell'operatore. Infatti, occorre ricordare che la segmentazione manuale è strettamente legata alla fruizione dell'immagine e, quindi, alla combinazione di due processi mentali, quali la percezione e l'interpretazione, che possono trarre in inganno l'operatore durante l'elaborazione. Ne consegue che, con tale tecnica, l'analisi dell'immagine può essere facilmente influenzata da inganni interpretativi e da fattori come la fatica e la variabilità che spingono l'operatore a formulare valutazioni diverse a distanza di tempo. Inoltre, la procedura manuale funziona correttamente solo nei casi in cui la morfologia dell'area segmentata sia, immagine per immagine, chiara e facilmente comprensibile. Questo è rilevante considerando la complessità della morfologia della cavità alveolare.

Al contrario, la tecnica automatica implementata con Mimics risulta più idonea alla segmentazione di alveoli dentali rilevati da immagini tomografiche, in quanto il contributo dell'operatore durante l'elaborazione è limitato soltanto alla ricostruzione del profilo buccale lasciando ampio spazio all'accuratezza di un algoritmo numerico capace di distinguere con maggiore precisione le diverse strutture anatomiche. Al contrario dell'occhio umano, che è in grado di distinguere nettamente in media 16 livelli di grigio, l'algoritmo numerico permette di discriminare anche tessuti con tonalità di grigio simili, grazie al valore d'intensità dei pixel con cui queste strutture vengono rappresentate nell'immagine di CBCT<sup>8</sup>. Nonostante questo, entrambe le tecniche di segmentazione automatica adottate in questo studio sono strettamente legate a un criterio di sogliatura, dove il valore soglia scelto ha un effetto rilevante sulla morfologia dell'area individuata e, quindi, sulla misura del volume della cavità post-estrattiva. In particolare, con una soglia troppo selettiva s'incorre nel rischio di non individuare la zona d'interesse, mentre con una soglia troppo bassa esiste il problema del sovra-riconoscimento e, quindi, dell'identificazione dei tessuti anche di non interesse. In particolare, se si confrontano tra loro le tecniche di segmentazione automatica, implementate rispettivamente con Mimics e ImageJ, è possibile notare che non vi sono differenze statisticamente significative e questo trova in parte spiegazione nella natura degli algoritmi utilizzati durante la fase di pre-processing e di Thresholding. Inoltre, per quanto riguarda la procedura di segmentazione automatica con Mimics, non si è evidenziata una significativa variabilità intra-operatore, tanto da far ipotizzare un'applicazione semplice e capace di fornire risultati sovrapponibili anche quando è utilizzata da operatori con diversi gradi di esperienza. Una difficoltà importante si è incontrata con la ricostruzione di immagine mediante ImageJ. A causa della sogliatura per mezzo di maschera binaria, ImageJ impedisce la visualizzazione dei tessuti molli così da perdere ogni riferimento alle strutture anatomiche circostanti. Questo ha creato difficoltà nella ricostruzione delle pareti alveolari mancanti e giustifica l'errore maggiore che si incontra con l'utilizzo di questo tipo di algoritmi. Complessivamente, con le misure ottenute dalle procedure d'immagine-processing manuale e automatica, è possibile evidenziare come la maggiore fonte di variabilità nella segmentazione sia rappresentata dal grado di distruzione ossea che complica il processo di riconoscimento della ROI.



Per ovviare alla mancanza di una geometria reale a volume noto, si è provveduto alla segmentazione di immagini di MicroCT rappresentanti un modello in PVC di un alveolo, realizzato con un processo di prototipazione rapida sottrattiva. Dalle prove effettuate è possibile notare come le differenze volumetriche rispetto al volume noto, fornito dalla scansione con MicroCT siano minime e come questo risultato sia legato all'elevata risoluzione spaziale e di contrasto delle immagini elaborate. Infatti, oltre a una risoluzione spaziale di 11.4  $\mu\text{m}$ , che ora permette il completo riconoscimento dell'oggetto d'interesse, nelle immagini di MicroCT il contrasto è netto in quanto l'oggetto si interfaccia solo con l'aria, mentre nelle immagini di CBCT l'operatore trova difficoltà a distinguere il confine tra la cavità alveolare e i diversi tessuti, a causa dei toni di grigio troppo simili. Inoltre, valutando i dati ottenuti dal rendering, solo la procedura implementata con ImageJ ha restituito un volume prossimo a quello reale, probabilmente grazie all'algoritmo di sogliatura che risulta più preciso nell'elaborazione di questo tipo di immagini. Paragonando però il volume noto ottenuto dal file .STL con i volumi alveolari medi implementati con il software ImageJ otteniamo una percentuale di errore di circa il 10%. Questo scarto di misura è dovuto alle difficoltà incontrate nel corretto riconoscimento dei tessuti e nella gestione della ricostruzione della parete vestibolare. L'analisi di figure anatomiche complesse, non finite e di piccole dimensione si ottiene implementando il software Mimics e adottando la tecnica di segmentazione automatica. Questo porta ad errori sul volume pari all'1.5% e precisione di  $\pm 0.44 \text{ mm}^3$ .

## Conclusioni

Con Mimics è possibile acquisire dati relativi all'anatomia tridimensionale ed al volume di cavità alveolari con morfologie anche complesse come quelle riscontrate in pazienti che necessitano di estrazioni per motivi parodontali. In considerazione dell'importanza biologica e funzionale del mantenimento e della ricostruzione dei tessuti persi, l'utilizzo di queste informazioni per la costruzione di scaffold tridimensionali sulla base dell'anatomia individuale potrebbe rappresentare una nuova sfida per la ricerca futura.

## Bibliografia

- Silva MA, Wolf U, Heinicke F, Bumann A, Visser H, Hirsch E (2008) Cone-beam computed tomography for routine orthodontic treatment planning: a radiation dose evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 133(5):019
- Mozzo P, Procacci C, Tacconi A, Martini PT, Andreis IA. A new volumetric CT machine for dental imaging based on the cone-beam technique: preliminary results. *Eur Radiol* 1998; 8: 1558 – 1564.
- Sukovic P. Cone beam computed tomography in craniofacial imaging. *Orthod Craniofac Res* 2003; 6 Suppl 1: 31 – 36.
- Gupta A, Kharbanda OP, Sardana V, Balachandran R, Sardana HK. Accuracy of 3D cephalometric measurements based on an automatic knowledge-based landmark detection algorithm. *Int J Comput Assist Radiol Surg*. 2015 Dec 24
- Piotr Szymor a, \*, Marcin Kozakiewicz a, Raphael Olszewski b Accuracy of open-source software segmentation and paper-based printed three-dimensional models *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 44 (2016) 202e209
- Choi JY, Choi JH, Kim NK, Kim Y, Lee JK, Kim MK, et al: Analysis of errors in medical rapid prototyping models. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31: 23e32, 2002
- Jazwiecka-Koscielniak E, Kozakiewicz M: A new modification of the individually designed polymer implant visible in X-ray for orbital reconstruction. *J Craniomaxillofac Surg* 42: 1520e1529, 2014
- Pimentel PA, Bomfim RT, Andrade LC, Ferraz EG, Ribeiro Lamberti PL, Rubira-Bullen IR, Sarmiento VAJ Dimensional error of three-dimensional images generated by different software *Med Eng Technol*. 2015 Nov;39(8):480-4.
- Huotilainen E, Jaanimets R, Valasek J, Marciani P, Salmi M, Tuomi J, et al: Inaccuracies in additive manufactured medical skull models caused by the DICOM to STL conversion process. *J Craniomaxillofac Surg* 42: 259e265, 2014
- Martorelli M, Ausiello P, Morrone R: A new method to assess the accuracy of a cone beam computed tomography scanner by using a non-contact reverse engineering technique. *J Dent* 42: 460e465, 2014

Riferimento:

Valeria Manavella, E-mail: [valeria.manavella@icloud.com](mailto:valeria.manavella@icloud.com)



## **TERAPIA NON CHIRURGICA DELLA PERI-IMPLANTITE. REVISIONE SISTEMATICA E META-ANALISI**

**Giacomo Piacentini\*, Gian Luca Spinoglio\*, Riccardo Beltrami°, Cesare Piacentini°, Maurizio Silvestri\***

*\*Pratica privata, Pavia*

*°Università degli studi di Pavia*

### **Riassunto**

**Introduzione:** La presente revisione sistematica si propone di valutare le prove scientifiche sull'efficacia dei trattamenti non chirurgici per la peri-implantite in associazione a misure aggiuntive rispetto alla sola pulizia meccanica in termini di variazione della profondità di sondaggio. **Materiali e metodi:** Una ricerca in MEDLINE-PubMed, Embase e Cochrane Central Register of controlled trials (CENTRAL) è stata condotta fino a novembre 2015. Sono stati considerati eleggibili per l'inclusione studi clinici randomizzati (RCT) e studi clinici controllati (CCT) con un follow-up di almeno 4 mesi e dati completi sui cambiamenti clinici della profondità di sondaggio. L'analisi di titoli, abstract e full-text ha portato all'inclusione di 10 pubblicazioni per l'analisi qualitativa e l'estrazione dei dati. I valori provenienti da tre di questi articoli sono stati raggruppati nelle meta-analisi. L'analisi dei sottogruppi si è basata sul metodo di misurazione utilizzato per valutare i miglioramenti dei segni di peri-implantite. **Risultati:** I risultati hanno mostrato che né le terapie singole né le associazioni di trattamenti hanno portato a miglioramenti significativi di PPD, CAL e BOP. Inoltre, non sembra esserci un protocollo clinico significativamente migliore di altri.

**Conclusioni:** L'associazione di pulizia meccanica e misure aggiuntive sembrerebbe migliorare i risultati della terapia non chirurgica della peri-implantite.

### **Introduzione**

Gli impianti dentali rappresentano un trattamento ampiamente utilizzato per la riabilitazione delle aree edentule e il tasso di sopravvivenza dopo dieci anni di funzione è di circa 89% (Pjetursson e coll. 2007). Tuttavia gli impianti non sono liberi da complicanze e la prognosi a lungo termine può essere alterata da problemi meccanici o infettivi (Berglundh e coll. 2002).

Le infezioni peri-implantari possono essere suddivise in due entità cliniche distinte: la mucosite e la peri-implantite.

La mucosite è un'inflammatione reversibile della mucosa peri-implantare, mentre la peri-implantite è un'inflammatione irreversibile dei tessuti peri-implantari caratterizzata anche dal riassorbimento osseo (Lindhe & Meyle, 2008).

I dati presenti in letteratura indicano che l'80% dei soggetti e il 50% degli impianti presentano mucosite, mentre il 28% e  $\geq 56\%$  dei soggetti e il 12% e 43% dei siti implantari rispettivamente mostrano peri-implantite (Zitzmann e coll. 2008).

La natura delle patologie peri-implantari è infettiva e il fattore eziologico principale è il biofilm batterico che si sviluppa sulla superficie degli impianti (Lang e coll. 2011).

Ci sono molteplici indicatori di rischio quali una scarsa igiene orale, una storia previa di parodontite e il fumo che possono influire sulla manifestazione e sulla progressione dell'infezione peri-implantare (Lindhe & Meyle 2008).

Lo scopo principale del trattamento delle patologie peri-implantari è la rimozione del biofilm batterico e la disinfezione della superficie dell'impianto, ma la presenza di spire e di rugosità superficiali rendono difficile il raggiungimento di tale obiettivo.

La terapia non chirurgica è il trattamento di prima linea per controllare le infezioni peri-implantari.

Diversi studi hanno dimostrato che i vari approcci clinici non chirurgici sono efficaci nel controllo della mucosite, diminuendo l'inflammatione gengivale e riducendo il sanguinamento al sondaggio. Tuttavia i risultati sul trattamento della peri-implantite sono contrastanti (Lindhe & Meyle 2008).

L'obiettivo primario della presente revisione sistematica della letteratura è di valutare l'evidenza scientifica sul trattamento non chirurgico della peri-implantite e di stimare l'eventuale beneficio della pulizia meccanica associata a misure aggiuntive rispetto alla pulizia meccanica da sola in termini di riduzione della profondità di sondaggio.

### **Materiali e metodi**

La presente revisione sistematica della letteratura e meta-analisi è stata realizzata seguendo le norme del PRISMA (Moher e coll. 2009) ed è stato sviluppato un protocollo che include i seguenti punti:

- Focused question
- Popolazione di studio
- Tipo d'intervento
- Tipo di controllo
- Variabili di studio
- Strategia di ricerca
- Criteri d'inclusione e di esclusione
- Misurazioni delle variabili
- Screening degli articoli inclusi ed estrazione dei dati
- Valutazione della qualità e sintesi dei dati
- Valutazione dell'eterogeneità e redazione delle conclusioni

### ***Focused Question***

La focused question, strutturata secondo il formato PICO (Miller & Forrest 2001), è: “Nei pazienti a cui è stata diagnosticata la peri-implantite, qual è l'efficacia della pulizia meccanica associata a misure aggiuntive rispetto alla pulizia meccanica da sola in termini di riduzione della profondità di sondaggio?”.

### ***Popolazione, Intervento, Controllo e Variabili di studio***

La popolazione d'interesse è rappresentata da pazienti in buone condizioni sistemiche, di età > 18 anni, con almeno un impianto che presenta peri-implantite.

La definizione di peri-implantite utilizzata è: “Una lesione infiammatoria che coinvolge la mucosa e l'osso intorno a un impianto in funzione” (Lindhe & Meyle, 2008). I trattamenti esaminati sono le terapie meccaniche non chirurgiche per la rimozione del biofilm dalla superficie implantare in associazione a misure aggiuntive; tali trattamenti sono stati comparati con la terapia meccanica sola.

La variabile primaria analizzata è la variazione della profondità di sondaggio (PPD) misurata in millimetri (mm) e le variabili secondarie sono il livello di attacco clinico (CAL) e il sanguinamento al sondaggio (BOP).

### ***Strategia di ricerca***

La ricerca è stata condotta da due revisore (GP e GLS) indipendenti e in parallelo, in tre diversi database: Pubmed, Central ed Embase fino al 30 Novembre 2015 incluso.

Le parole chiave e i termini Mesh sono stati usati in combinazione come segue:

#### ***Population:***

("Peri implantitis" OR periimplantitis OR perimplantitis OR peri-implantitis OR peri-implant\* OR "peri implant\*" OR perimplant\* OR periimplant\* OR "Peri-Implantitis" [Mesh])

#### ***Intervention***

(treatment OR therapy OR prevention OR management OR maintenance OR "non-surgical" OR "Therapeutics" [Mesh] OR ("Tertiary Prevention" [Mesh] OR "Secondary Prevention" [Mesh] OR "Primary Prevention" [Mesh]) OR "Disease Management" [Mesh])).

Inoltre è stata effettuata una ricerca manuale sui seguenti giornali: Journal of Clinical Periodontology, Journal of Periodontology, Clinical Implant Dentistry, Clinical Oral Implants Research, European Journal of Oral Implantology, International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, Journal of Oral Implantology, International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry.

La bibliografia degli studi inclusi è stata analizzata per verificare eventuali referenze incrociate.

È stata effettuata un'ulteriore ricerca della letteratura grigia attraverso il portale Opengrey (<http://www.opengrey.eu>) utilizzando le parole “peri-implantitis” AND “treatment” per questo specifico database. Non è stata applicata alcuna restrizione di lingua.

Gli autori degli studi esaminati sono stati contattati per ricevere informazioni aggiuntive qualora fosse necessario.

### ***Criteri d'inclusione e di esclusione***

Sono stati inclusi studi clinici randomizzati (RCT), con disegno split-mouth o a gruppi paralleli e studi di coorte prospettici a gruppi paralleli con un follow-up minimo di 4 mesi.

#### ***Criteri d'inclusione***

- Studi su umani
- Trattamento professionale non-chirurgico della peri-implantite
- Dati completi sui cambiamenti clinici della profondità di sondaggio (PPD)

### ***Criteri di esclusione***

- < 10 impianti/gruppo
- Assenza di dati completi sui cambiamenti clinici della profondità di sondaggio.

### ***Criteri di selezione degli studi***

Due revisori indipendenti (GP e GLS) e in parallelo hanno realizzato lo screening dei titoli e degli abstract ed eseguito la prima fase della ricerca.

Ogni disaccordo è stato discusso con un terzo revisore (RB) fino al raggiungimento del consenso.

Inizialmente sono stati analizzati i titoli, eliminando gli articoli non conformi ai criteri d'inclusione.

Successivamente, sono stati vagliati gli abstract e sono stati selezionate le pubblicazioni idonee per la lettura del testo completo. Gli articoli con informazione incompleta o non chiara nel titolo o nell'abstract sono stati letti interamente.

Infine sono stati selezionati per l'analisi gli articoli che rispettavano i criteri d'inclusione.

### ***Sintesi dei dati***

Per gli studi inclusi è stata redatta una tabella specifica con le seguenti caratteristiche:

- Autore, titolo e anno di pubblicazione
- Disegno dello studio e definizione di peri-implantite adottata
- Numero di partecipanti
- Caratteristiche dei partecipanti, quali abitudine al fumo e stato parodontale
- Numero e tipo d'impianti trattati
- Trattamenti effettuati
- Metodo di misurazione delle variabili
- Variabili riportate nei risultati
- Luogo di realizzazione dello studio ed eventuali finanziamenti

### ***Valutazione della qualità degli studi selezionati***

La valutazione della qualità dei protocolli inclusi è stata eseguita da un unico revisore (RB) ed è stata effettuata seguendo le norme dello strumento fornito dal Cochrane Collaboration Group (Higgins & Green, 2011).

Inizialmente è stato analizzato se gli studi selezionati rispettassero i seguenti criteri:

- Sequence generation.
- Allocation Concealment
- Blinding of participants
- Incomplete outcome data
- Selective outcome reporting
- Other sources of bias

In seguito, il revisore ha assegnato un punteggio a basso ("–"), alto ("+") o incerto ("?") rischio di bias.

In base allo stesso punteggio, è stata ottenuta una valutazione globale del bias per ogni articolo.

Le pubblicazioni sono state considerate a basso rischio se tutti e cinque i parametri sopra citati erano bassi.

Se un criterio era alto, il lavoro era considerato ad alto rischio.

Quando un criterio era dubbio, il lavoro era considerato a rischio dubbio.

Quando almeno due criteri erano dubbi, il rischio di bias dello studio è stato valutato come alto.

### ***Analisi statistica***

Il coefficiente di correlazione inter-esaminatore è stato calcolato mediante il test della K di Cohen.

Sono state estratte la media e la deviazione standard dei cambiamenti di profondità di sondaggio, livello di attacco clinico e sanguinamento al sondaggio.

Nel caso in cui i risultati di uno studio fossero stati ripetutamente pubblicati, il set di dati più completo è stato inserito solo una volta.

Per la comparazione tra gli studi, i dati dell'outcome primario e degli outcomes secondari sono stati raggruppati e analizzati mediante la differenza delle medie pesate sulla numerosità campionaria con un intervallo di confidenza del 95%.

I dati sono stati analizzati usando un modello a effetti casuali (Dersimonian-Laird test).

Sono stati elaborati Forest Plots per illustrare gli effetti degli studi inclusi nella meta-analisi.

Il bias delle pubblicazioni è stato valutato mediante Funnel Plots e il metodo della regressione lineare di Egger per tutti gli outcomes considerati.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato uno specifico software (STATA® 13, StataCorp LP, Lakeway Drive, College Station, TX, USA). La significatività statistica è stata definita come  $p < 0,05$ .

## Risultati

La ricerca sui database elettronici ha fornito 3590 risultati. Tra questi, sono stati considerati 3588 lavori dopo l'eliminazione dei duplicati.

Durante la prima fase di selezione degli studi (concordanza tra i revisori: 89.53%;  $K = 0.46$ ), 3564 articoli sono stati esclusi sulla base dei titoli e degli abstract.

L'analisi del testo completo è stata effettuata su 26 pubblicazioni e 16 di queste sono state escluse per i seguenti motivi: assenza del gruppo controllo, studi microbiologici, mancanza di dati completi sui cambiamenti della profondità di sondaggio, mancanza di informazioni sulla deviazione standard, studi su terapie chirurgiche, presenza di dati pubblicati più recenti. Sono stati quindi inclusi 10 studi per l'analisi (Figura 1).

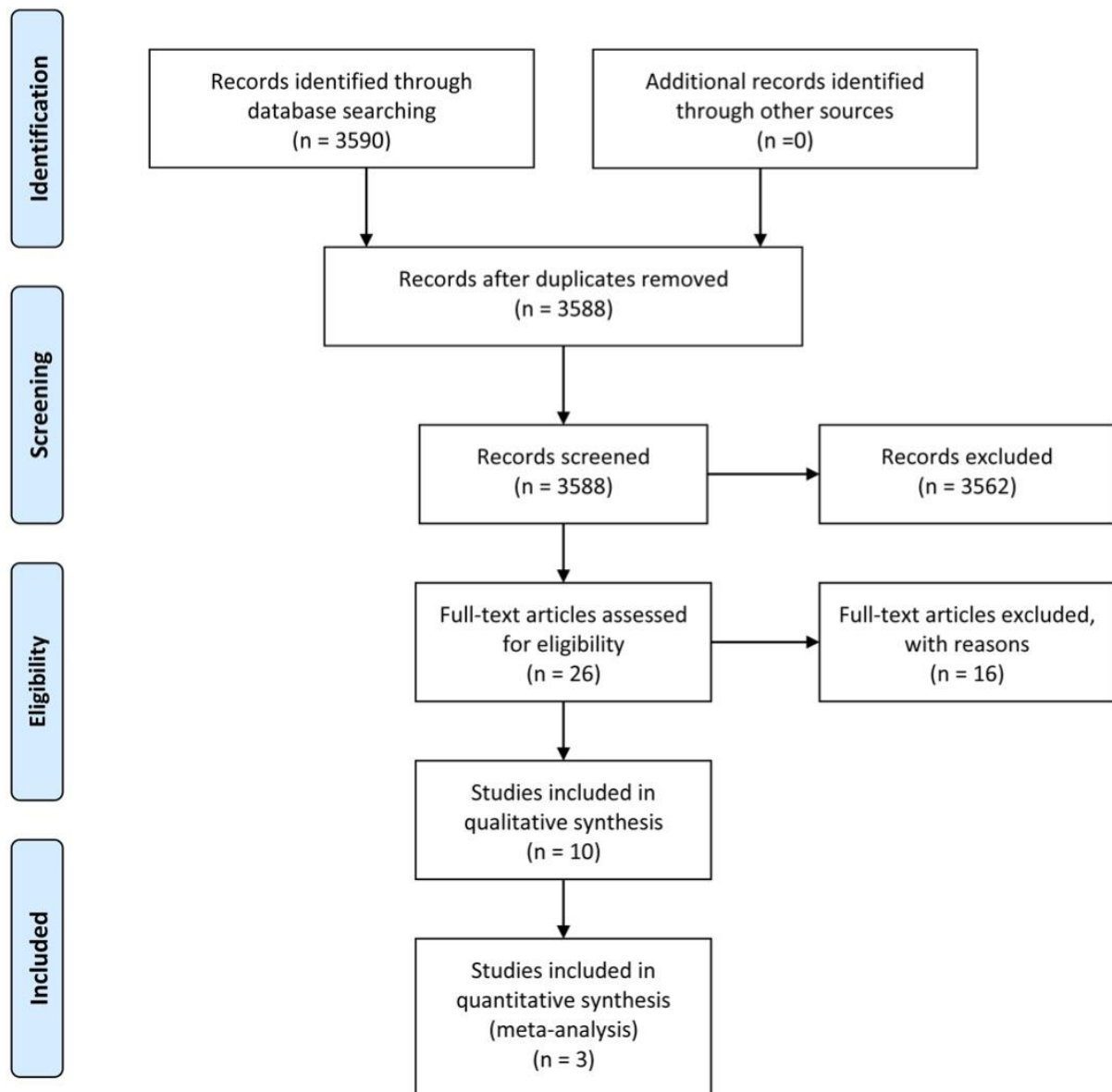


Figura 1: Tutte le informazioni che riguardano le caratteristiche degli studi selezionati sono presentate nella



Study	Study Design	Care definition	Participants	Type of Implant	Treatments	Method of measurement	Results	Site and Funding
Büchter et al. (2004)	RCT parallel, 2 Groups, Single-Blind, 4 months follow-up	Chronic peri-implantitis: > 50% bone loss around implants	28 individuals (10), 48 implants Aged: 55 Smoking status: 32% Smokers, Periodontal Status: NA	Type of Implant: ITI, Straumann® Surface: SLA	Test: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2% irrigations + Doxycycline 8.5% irrigations Control: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2% irrigations	PCP IL, 4 sites/implant	PPD, PAl, BOP	NA
Schwarz et al. (2005)	RCT parallel, 2 groups, 6 months follow-up	Probing Depth ≥ 4 mm in association with RX bone loss, BOP or SLIP on probing	20 individuals (10) 32 implants Aged: 50 Smoking Status: No Smokers Periodontal Status: NA	Type of Implant: No Cylindrical Implants Surface: 17 SLA, 15 TPS	Supramaximal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste. Test: Er:YAG laser Control: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2% irrigations + Chlorhexidine 0.2% Gel	PCP IL, 8 sites/implant	PI, BOP, PPD, Wt, CAL	NA
Karring et al. (2005)	RCT split-mouth, 2 Groups, Single-Blind, 6 months follow-up	BOP, PPD ≥ 5 mm, ≥ 1.5 mm Ribone loss and exposed implant thread (Mombelli & Lang 1998)	11 individuals (10), 2 implants/individual Aged: 50-78 Smoking Status: NA Periodontal Status: Exclusion of Chronic Severe Periodontitis	Type of Implant: Screw-Shaped, 4 Brånemark, 8 ITI, 10 Astra Same Implants/Individual	Test: Vector® Control: Carbon Courettes	IL IL, 8 sites/implant, intraoral RX	PI, BOP, PPD, PI, RI bone level	NA, Bion Dental
Renvert et al. (2006)	RCT parallel, 2 Groups, Single-Blind, 12 months follow-up	PPD ≥ 4 mm + BOP/SLIP at 0.2 N probing force + micro sample	32 individuals (10), Aged: 64 Smoking Status: 23 Smokers Periodontal Status: NA	Type of Implant: Brånemark	Supramaximal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste Test: Minocycline Hydrochloride microsphere Control: Chlorhexidine 1% Gel	Heave Click Probe 0.2 N, 4 sites/implant, TVC	FMPs, FMBs, UPL, PPD, BOMS, BOP, Microbiological Sample	Sweden, OraPharma Inc.
Renvert et al. (2008)	RCT parallel, 2 Groups, Single-Blind, 12 months follow-up	PPD ≥ 4 mm + BOP/SLIP at 0.2 N probing force + micro sample	32 individuals (10), Aged: 61, Smoking Status: 18 Smokers Periodontal Status: NA	Type of Implant: Brånemark Surface: Machined surface	Test: Scaling and Root Planing + Minocycline Hydrochloride microsphere Control: Scaling and Root Planing + Chlorhexidine 1% Gel	NA, 0.2 N 4 sites/implant, TVC	BOL, PPD, FMBs, BOP, FMPs, UPL, Microbiological Sample	Sweden, OraPharma Inc.
Renvert et al. (2009)	RCT parallel, 2 Groups, Single-Blind, 6 months follow-up	PPD ≥ 4 mm + BOP/SLIP at 0.2 N probing force	37 individuals (10), 1 implant/individual Aged: 65 Smoking Status: 5 smokers Periodontal Status: Treated	Type of Implant: 24 Nobel Biocare, 4 Astra, 1 Unknown	Test: Vector® + Rubber cups and polishing paste Control: Titanium Courettes + Rubber cups and polishing paste	Heave Click Probe Calibrated force 0.2 N 4 sites/implant	Highest PPD, Implant Mean PPD, Highest BOP, Implant Mean BOP, FMBs, Implant Mean PI, FMPs, Microbiological Sample	Sweden, Clinical Research Foundation
Sahn et al. (2011)	RCT parallel, 2 Groups, Single-Blind, 6 months follow-up	Mombelli & Lang (1994a)	32 individuals (10), 43 implants, Aged: 61, Smoking Status: No Smokers Periodontal Status: Treated	Type of Implant: 6 Brånemark®, 12 Coning Screw Lines®, 2 Friuli®, 9 ITI®, 9 Tapered Screw Vent®, 5 Unknown	Test: PERIOZ® with Glycine Powder Control: Carbon Courettes + Chlorhexidine 1% Gel	PCP IL, 8 sites/implant	PI, BOP, PD, Wt, CAL	Germany, Electric Medical Systems
Bassetti et al. (2014)	RCT parallel, 2 groups, 12 months follow-up	PPD 4-6 mm + BOP, 0.5-2 mm RX bone loss between suprastructure installation and pre-screening appointment.	40 individuals (10), 39 implants 1 implant/individual, Aged: 58 Smoking status: na, Periodontal Status: 26 subjects with history of periodontitis	Type of Implant: Titanium screw-shaped implants, Straumann® Surface: SLA	Carbon Courettes + Glycine Air Powder Test: Photodynamic Therapy Control: Minocycline Hydrochloride Microspheres	UNCISS Calibrated force 0.25-0.25 N, 6 sites/implant, ELISA + PCR	PPD, CAL, BOP, ROC, mPI, Microbiological Sample	Switzerland, Bredent Medical GmbH & Co. KG
John et al. (2015)	RCT parallel, 2 groups, Single-Blind, 12 months follow-up	Initial-Moderate Peri-implantitis: PPD ≥ 4 mm + BOP/SLIP, RX bone loss < 30% compared to the situation after implant placement.	32 individuals (10), 36 implants Aged: 62 Smoking status: non-smokers Periodontal status: Healthy/Treated	Type of Implant: Screw-type titanium implants, 5 Brånemark, 10 Coning Screw Lines®, 9 ITI, 2 Friuli®, 7 Tapered Screw Vent®, 3 NA	Supramaximal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste. Test: Carbon Courettes + Chlorhexidine 0.1% submaximal irrigation + Chlorhexidine 1% gel submaximal application Control: Aminoacid Glycine Powder submaximal application	PCP IL, 8 sites/implant	PI, BOP, PPD, GR, CAL	Germany, EMS
Gomi et al. (2015)	RCT parallel, 2 Groups, 12 months follow-up	Patients corresponding to CIST class C or D (Lang 2004).	20 individual (10), Aged: 68 Smoking Status: NA Periodontal Status: Chronic Periodontitis	NA	Supragingival Scaling Test: Ultrasonic scaler with plastic tips + Plastic Courettes + Systemic Azitromicin starting 3 days before 500 mg/day Control: Ultrasonic scaler with plastic tips + Plastic Courettes	NA, 6 sites/implant, PCR	PPD, BOP, GI, Microbiological Samples, Host-Derived Biomarkers	Japan, NA

Figura 2

### Valutazione della qualità

Tra gli studi selezionati, 8 sono stati considerati ad alto rischio di bias, mentre 2 sono stati considerati a basso rischio.

### Outcomes degli studi

Gli studi selezionati sono stati suddivisi in funzione delle variabili analizzate.

Le Fig. 3, 4 e 5 rappresentano rispettivamente i risultati in funzione della variazione della profondità di sondaggio (PPD), del livello di attacco clinico (CAL) e del sanguinamento al sondaggio (BOP).

### Analisi descrittiva delle variazioni della profondità di sondaggio (Figura 3)

Tutti gli studi inclusi hanno analizzato la variazione della profondità di sondaggio.

I dati mostrano una riduzione che varia da 0 mm usando il sistema Vector® (Karring e coll. 2009) a  $1,19 \pm 0,39$  mm utilizzando un'associazione di sistemi ultrasonici, courettes di plastica e somministrazione sistemica di Azitromicina 500 mg/giorno per 3 giorni iniziando 3 giorni prima della pulizia meccanica (Gomi e coll. 2015).

Study	Intervention/control	Measurement method	Test difference	Control difference	Difference	P value
Büchter et al. (2004)	Test: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2% irrigations + Doxycycline 8.5% irrigations Control: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2% irrigations	PCP 11, 4 sites/implant	1.15 ± 0.23 mm	0.56 ± 0.30 mm	0.59 ± 0.53 mm	0.046
Schwarz et al. (2005)	Supramucosal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste. Test: Er:YAG laser Control: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2%	PCP 12, 6 sites/implant	0.8 ± 0.1 mm	0.6 ± 0.1 mm	0.2 ± 0.2 mm	< 0.001
Karring et al. (2005)	Test: Vector * Control: Carbon Courettes	LL 20, 4 sites/implant	0 ± 0.1 mm	0.1 ± 0.6 mm	0.1 ± 0.7 mm	> 0.1
Renvert et al. (2006)	Supramucosal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste Test: Minocycline Hydrochloride microsphere Control: Chlorhexidine 1% Gel	Hawe Click-Probe 0.2 N, 4 sites/implant	0.3 ± 0.1 mm	0 ± 0.1 mm	0.3 ± 0.2 mm	< 0.01
Renvert et al. (2008)	Test: Scaling and Root Planing + Minocycline Hydrochloride microsphere Control: Scaling and Root Planing + Chlorhexidine 1% Gel	NA, 0.2 N 4 sites/implant, TVC	0.34 ± 0.06 mm	0.19 ± 0.14 mm	0.15 ± 0.2 mm	< 0.001
Renvert et al. (2009)	Test: Vector * + Rubber cups and polishing paste Control: Titanium Courettes + Rubber cups and polishing paste	Hawe Click-Probe Calibrated force 0.2 N 4 sites/implant	0.4 ± 0.2 mm	0 mm	0.4 ± 0.2 mm	NA
Sahm et al. (2011)	Test: PERIOFLOW® with Glycine Powder Control: Carbon Courettes + Chlorhexidine 1% Gel	PCP 12, 6 sites/implant	0.8 ± 0.9 mm	0.8 ± 0.5 mm	0 ± 1.4 mm	> 0.05
Bassetti et al. (2014)	Carbon Courettes + Glycine Air Powder Test: Photodynamic therapy Control: Minocycline Hydrochloride Microspheres	UNC15 Calibrated force 0.15- 0.25 N, 6 sites/implant	0.36 ± 0.03 mm	0.49 ± 0.01 mm	0.07 ± 0.04 mm	> 0.05
John et al. (2015)	Supramucosal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste. Test: Carbon Courettes + Chlorhexidine 0.1% submucosal irrigation + Chlorhexidine 1% gel submucosal application Control: Aminoacid Glycine Powder submucosal application	PCP 12 6 sites/implant	0.5 ± 0.9 mm	0.4 ± 0.9 mm	0.1 ± 1.8 mm	>0.05
Gomi et al. (2015)	Supragingival Scaling, Test: Ultrasonic Scaler with plastic tips + Plastic Courettes + Systemic Azitromicin starting 3 days before 500 mg/day Control: Ultrasonic Scaler with plastic tips + Plastic Courettes	NA, 6 sites/implant	1.19 ± 0.39 mm	0.23 ± 0.01 mm	0.96 ± 0.4 mm	0.01

Figura 3

#### Analisi descrittiva delle variazioni del livello di attacco clinico (Figura 4)

Cinque tra gli studi selezionati hanno presentato i dati delle variazioni del livello di attacco clinico.

I risultati mostrano un guadagno di attacco clinico compreso tra  $0,16 \pm 0,04$  mm usando una combinazione di courettes di carbonio, spray di glicina e terapia fotodinamica (Bassetti e coll. 2014) e  $1,15 \pm 0,03$  mm utilizzando courettes di plastica, irrigazioni sottogengivali di clorexidina 0,2% e irrigazioni di tetraciclina 8,5% (Büchter e coll. 2004).

Study	intervention/ control	Measurement method	Test	Control	Difference	P value
Büchter et al. (2004)	Test: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2% Irrigations + Doxycycline 8.5% Irrigations Control: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2% irrigations	distance from the implant shoulder to the bottom of the peri-implant pocket, 4 sites/implant	1.15 ± 0.03 mm	0.33 ± 0.06 mm	0.82 ± 0.09 mm	0.024
Schwarz et al. (2005)	Supramucosal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste. Test: Er:YAG laser Control: Plastic Courettes + Chlorhexidine 0.2%	from the implant neck to the bottom of the probeable sulcus, 6 sites/implant	0.6 ± 0.1 mm	0.7 ± 0 mm	0.1 ± 0.1 mm	> 0.05
Sahm et al. (2011)	Test: PERIOFLOW® with Glycine Powder Control: Carbon Courettes + Chlorhexidine 1% Gel	from implant neck to the bottom of the probeable pocket, 6 sites/implant	0.5 ± 0.8 mm	0.4 ± 0.7 mm	0.1 ± 1.5 mm	> 0.05
Bassetti et al. (2014)	Carbon Courettes + Glycine Air Powder Test: Photodynamic therapy Control: Minocycline Hydrochloride Microspheres	NA, 6 sites/implant	0.16 ± 0.04 mm	0.19 ± 0.07 mm	0.03 ± 0.11 mm	> 0.05
John et al. (2015)	Supramucosal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste. Test: Carbon Courettes + Chlorhexidine 0.1% submucosal irrigation + Chlorhexidine 1% gel submucosal application Control: Aminoacid Glycine Powder submucosal application	from implant neck to the bottom of the probeable pocket, 6 sites/implant	0.5 ± 1.1 mm	0.6 ± 1.3 mm	0.1 ± 0.3 mm	> 0.05

Figura 4

#### Analisi delle variazioni del sanguinamento al sondaggio (Figura 5)

Otto degli studi selezionati hanno presentato i dati delle variazioni del sanguinamento al sondaggio tra l'inizio e il termine dello studio.

I dati mostrano che la riduzione del sanguinamento al sondaggio varia da  $0,13 \pm 0,01$  mediante l'uso di courettes di plastica e irrigazioni sottogengivali di clorexidina 0,2% (Büchter e coll. 2004) a  $43,5 \pm 27,7$  utilizzando courettes di plastica e applicazione sottogengivale di gel di clorexidina 1% (Sahm e coll. 2011).

Study	intervention/ control	Measurement method	Test	Control	Difference	P value
Büchler et al. (2004)	Test: Plastic Couettes + Chlorhexidine 0.2% irrigations + Doxycycline 8.5% irrigations Control: Plastic Couettes + Chlorhexidine 0.2% irrigations	presence of bleeding within 30 s after the pocket had been probed with a periodontal probe, 4 sites/implant	0.27 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.01
Renvert et al. (2006)	Supramucosal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste Test: Minocycline Hydrochloride microsphere Control: Chlorhexidine 1% Gel	bleeding appearing at the mucosal margin after paper-point sampling of the deepest site, and bleeding after recordings of probing depth at the other three sites, expressed as a percentage of implant sites within each patient, 4 sites/implant	33 ± 13	7 ± 0	26 ± 13	< 0.01
Renvert et al. (2008)	Test: Scaling and Root Planing + Minocycline Hydrochloride microsphere Control: Scaling and Root Planing + Chlorhexidine 1% Gel	0 (no bleeding) or 1 (bleeding) after microbial sampling, NA	45.9 ± 2.7	26.4 ± 2.9	19.5 ± 5.6	0.001
Renvert et al. (2009)	Test: Vector® + Rubber cups and polishing paste Control: Titanium Couettes + Rubber cups and polishing paste	presence/absence of BOP at the implant and bleeding appearing after IPD measurements of probing depth and expressed as a percentage of examined sites, 4 sites/implant	6.7 ± 3.1	4.4 ± 6	2.3 ± 9.1	> 0.05
Sahn et al. (2011)	Test: PERIOFLOW® with Glycine Powder Control: Carbon Couettes + Chlorhexidine 1% Gel	evaluated as present if bleeding was evident within 30 s after probing, or absent, if no bleeding was noticed within 30 s after probing, 6 sites/implant	11 ± 15.7	43.5 ± 27.7	32.5 ± 12	< 0.05
Bassetti et al. (2014)	Carbon Couettes + Glycine Air Powder Test: Photodynamic therapy Control: Minocycline Hydrochloride Microspheres	presence of bleeding within 10-15 s after the pocket had been probed with a periodontal probe, 6 sites/implant	2.52 ± 0.25	2.31 ± 0.08	0.21 ± 0.33	< 0.05
John et al. (2015)	Supramucosal/gingival professional implant/tooth cleaning with rubber cups and polishing paste. Test: Carbon Couettes + Chlorhexidine 0.1% submucosal irrigation + Chlorhexidine 1% gel submucosal application Control: Aminoacid Glycine Powder submucosal application	present if bleeding was evident within 30 s after probing, or absent, if no bleeding was noticed within 30 s after probing, 6 sites/implant	16.6 ± 33.4	41.2 ± 29.5	24.6 ± 63.9	< 0.05
Gomi et al. (2015)	Supragingival Scaling, Test: Ultrasonic Scaler with plastic tips + Plastic Couettes + Systemic Azithromycin starting 3 days before 500 mg/day Control: Ultrasonic Scaler with plastic tips + Plastic Couettes	scored positive if bleeding was visible within 30 seconds after probing, 6 sites/implant	24.5 ± 3.9	6.1 ± 1.5	18.4 ± 5.4	< 0.001

Figura 5

### Meta-analisi (Figura 6, Figura 7)

Soltanto tre degli studi selezionati (Karring et al. 2005, Renvert et al. 2009, Gomi et al. 2015) presentavano gruppi controllo comparabili e sono quindi stati inclusi nella meta-analisi.

Gli altri studi sono stati raggruppati in funzione della variabile presa in esame.

L'outcome primario analizzato è stato la variazione della profondità di sondaggio.

Un totale di 68 pazienti e 79 impianti sono stati inclusi nella meta-analisi. In uno studio (Renvert e coll. 2009) sono stati documentati 6 drop-out.

Sono state sviluppate due comparazioni, rispettivamente a tre e a sei mesi, per valutare l'influenza dei diversi protocolli terapeutici.

Gli studi mostravano differenze nell'esecuzione dei protocolli e quindi è stato utilizzato un modello a effetti random.

I risultati non hanno mostrato variazioni statisticamente significative della profondità di sondaggio in nessuno dei gruppi a 3 mesi (OR = 1.084, 95 % CI 0.384 - 3.064, p = 0.879) o a 6 mesi (OR = 1.091, 95 % CI 0.384 - 3.105, p = 0.870). Dunque, l'uso di misure aggiuntive quali la terapia fotodinamica, gli antisettici o gli antibiotici non ha dimostrato di conferire benefici aggiuntivi rispetto alla terapia meccanica.

Gli studi inclusi presentavano una bassa eterogeneità (I<sup>2</sup>=0%). I risultati della regressione di Egger hanno messo in luce che non è presente bias di pubblicazione.

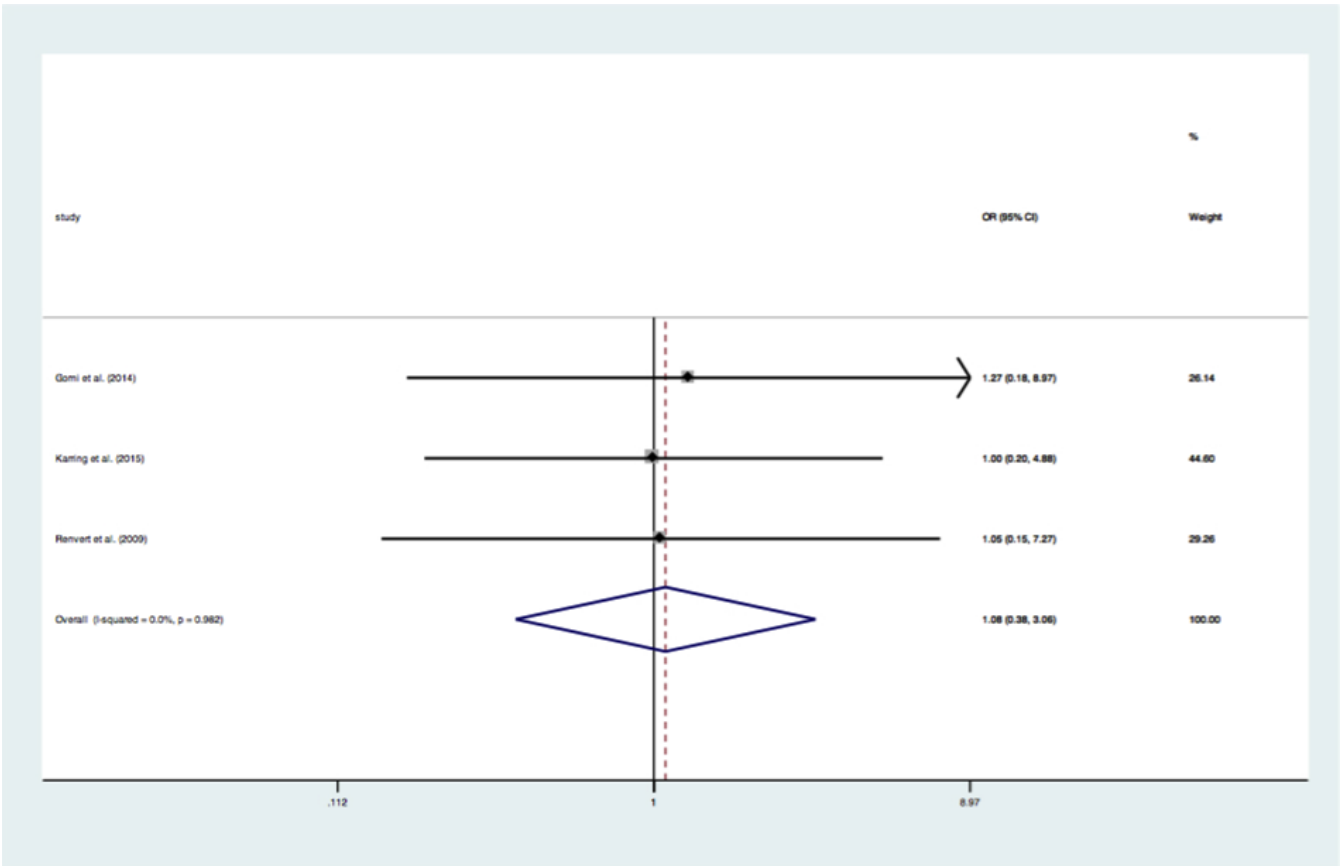


Figura 6

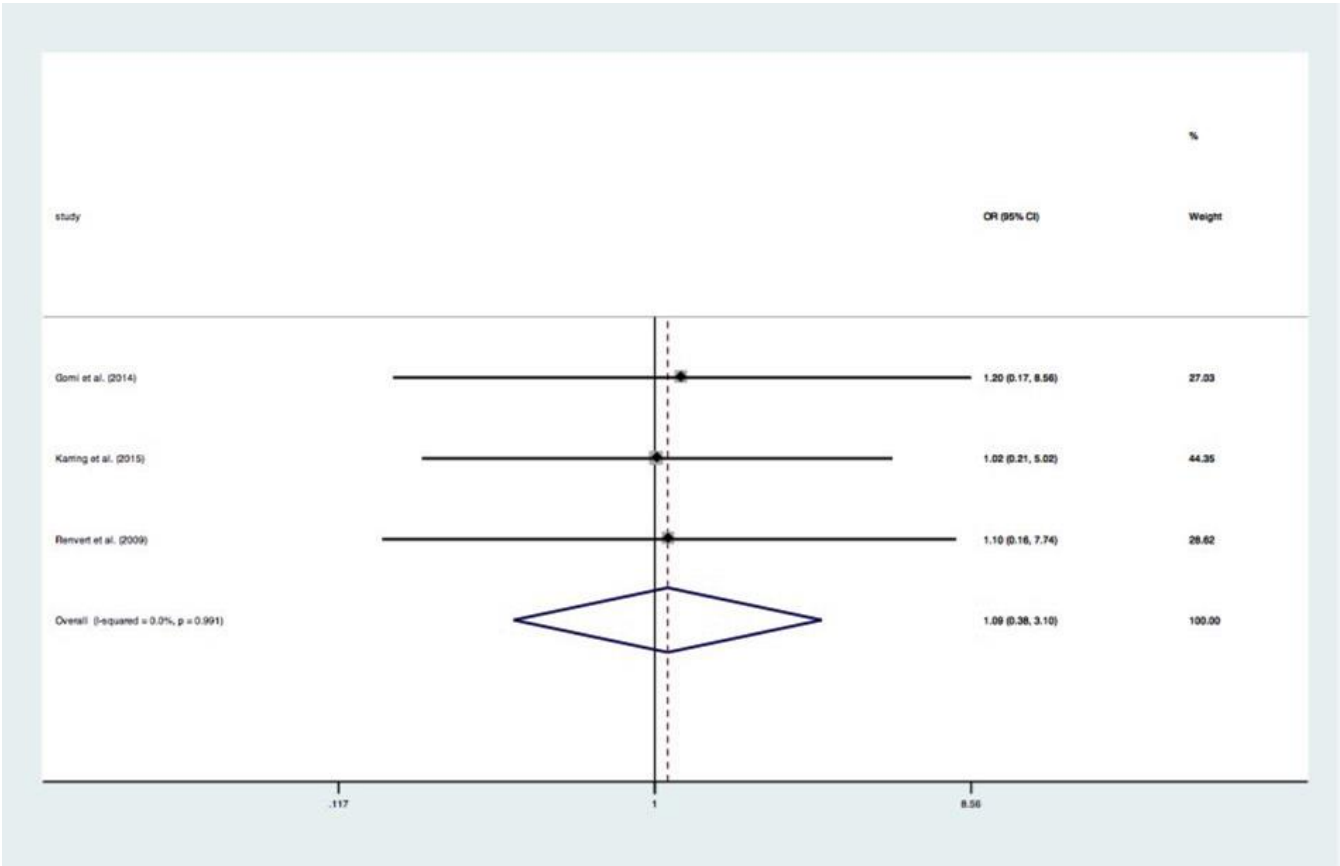


Figura 7

## Discussione e Conclusioni

Diverse terapie singole o in combinazione sono state utilizzate per il trattamento non chirurgico della peri-implantite.

L'outcome primario analizzato è stata la variazione della profondità di sondaggio e gli outcomes secondari sono stati la variazione del livello di attacco clinico e del sanguinamento al sondaggio.

I risultati della meta-analisi dimostrano che le terapie meccaniche non chirurgiche della peri-implantite associate a misure aggiuntive non determinano risultati significativamente superiori rispetto all'uso di sole terapie meccaniche.

C'è una leggera tendenza verso risultati clinici migliori in termini di riduzione della profondità di sondaggio quando si applicano terapie meccaniche combinate.

Tra le diverse combinazioni sembra che l'uso di antibiotici in associazione alla pulizia meccanica della superficie implantare permetta di ottenere una maggiore riduzione della profondità di sondaggio rispetto all'uso di altre misure aggiuntive quali gli antisettici.

In particolare, uno studio (Gomi e coll. 2015) ha dimostrato che la somministrazione sistemica di azitromicina (500 mg per 3 giorni, 3 giorni prima della terapia professionale) in associazione alla pulizia meccanica porta a risultati clinici superiori e a una riduzione della profondità di sondaggio di  $1,19 \pm 0,39$  mm a 12 mesi di follow-up.

Un'ulteriore interpretazione dei dati permette di osservare che la terapia combinata si associa a un maggiore guadagno di attacco clinico e riduzione del sanguinamento al sondaggio.

Uno studio dimostra che l'uso aggiuntivo di antibiotico locale porta a un guadagno d'attacco clinico superiore rispetto alla terapia meccanica sola, pari a  $1,15 \pm 0,03$  mm.

Tuttavia i risultati della presente revisione sistematica della letteratura devono essere interpretati con cautela.

I lavori esaminati presentano un'elevata eterogeneità per il disegno dello studio, per le caratteristiche iniziali dei partecipanti e per i protocolli clinici adottati.

Mentre in alcuni protocolli la terapia è stata realizzata in un'unica seduta, in altri sono state effettuate ripetute applicazioni.

È inoltre presente un'elevata differenza tra i gruppi controllo. Infatti, in molti studi le stesse terapie sono utilizzate sia come test sia come controllo. Ciò significa che al momento non esiste una terapia gold-standard per il trattamento non chirurgico della peri-implantite.

In conclusione la terapia non chirurgica della peri-implantite sembra avere un'efficacia limitata per il controllo dell'infezione e la riduzione della profondità di sondaggio. La combinazione di terapie sembra in grado di fornire risultati migliori rispetto ai trattamenti singoli.

È necessario inoltre standardizzare il disegno dei protocolli e delle procedure cliniche effettuate per ridurre l'eterogeneità presente tra gli studi.

## Bibliografia

- Bassetti, M., Schär, D., Wicki, B., Eick, S., Ramseier, C. A., Arweiler, N. B., Sculean, A. & Salvi, G. E. (2014) Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **25**: 279-287
- Berglundh, T., Persson, L. & Klinge, B. (2002) A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol* **29**: 197-212; discussion 232-193
- Büchter, A., Meyer, U., Kruse-Lösler, B., Joos, U. & Kleinheinz, J. (2004) Sustained release of doxycycline for the treatment of peri-implantitis: Randomised controlled trial. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **42**: 439-444
- Gomi, K., Matsushima, Y., Ujiie, Y., Shirakawa, S., Nagano, T., Kanazashi, M. & Yashima, A. (2014) Full-mouth scaling and root planing combined with azithromycin to treat peri-implantitis. *Australian Dental Journal*: n/a-n/a
- Higgins, J.P.T. & Green, S. (eds) *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0* [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from [www.cochrane-handbook.org](http://www.cochrane-handbook.org) (accessed on 31 May 2010)
- John, G., Sahm, N., Becker, J. & Schwarz, F. (2015) Nonsurgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine. Twelve-month



- follow-up of a prospective, randomized, controlled clinical study. *Clinical Oral Investigations* **19**: 1807-1814
- Karring, E. S., Stavropoulos, A., Ellegaard, B. & Karring, T. (2005) Treatment of peri-implantitis by the vector system. *Clin Oral Implants Res* **16**: 288-293
  - Lang, N. P., Berglundh, T. & Working Group 4 of Seventh European Workshop on, P. (2011) Periimplant diseases: Where are we now?--consensus of the seventh european workshop on periodontology. *J Clin Periodontol* **38**: 178-181
  - Lindhe, J., Meyle, J. & Group, D. o. E. W. o. P. (2008) Peri-implant diseases: Consensus report of the sixth european workshop on periodontology. *J Clin Periodontol* **35**: 282-285
  - Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G. & Group, P. (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The prisma statement. *J Clin Epidemiol* **62**: 1006-1012
  - Pjetursson, B. E., Bragger, U., Lang, N. P. & Zwahlen, M. (2007) Comparison of survival and complication rates of tooth-supported fixed dental prostheses (fdps) and implant-supported fdps and single crowns (scs). *Clin Oral Implants Res* **18**: 97-113
  - Renvert, S., Lessem, J., Dahlén, G., Lindahl, C. & Svensson, M. (2006) Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **33**: 362-369
  - Renvert, S., Lessem, J., Dahlén, G., Renvert, H. & Lindahl, C. (2008) Mechanical and repeated antimicrobial therapy using a local drug delivery system in the treatment of peri-implantitis: A randomized clinical trial. *J Periodontol* **79**: 836-844
  - Renvert, S., Samuelsson, E., Lindahl, C. & Persson, G. R. (2009) Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: A double-blind randomized longitudinal clinical study. I: Clinical results. *J Clin Periodontol* **36**: 604-609
  - Sahm, N., Becker, J., Santel, T. & Schwarz, F. (2011) Non-surgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine: A prospective, randomized, controlled clinical study. *J Clin Periodontol* **38**: 872-878
  - Schär, D., Ramseier, C. A., Eick, S., Arweiler, N. B., Sculean, A. & Salvi, G. E. (2013) Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: Six-month outcomes of a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **24**: 104-110
  - Schwarz, F., Sculean, A., Rothamel, D., Schwenzer, K., Georg, T. & Becker, J. (2005) Clinical evaluation of an Er:Yag laser for nonsurgical treatment of periimplantitis: A pilot study. *Clin Oral Implants Res* **16**: 44-52
  - Zitzmann, N. U. & Berglundh, T. (2008) Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* **35**: 286-291

Riferimento

Giacomo Piacentini – E-mail: [giacomo.piace@gmail.com](mailto:giacomo.piace@gmail.com)

## REVISIONE SISTEMATICA DELLA QUALITÀ DEL REPORTING E DELLA METODOLOGIA NEGLI STUDI DI ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMI DEI GENI DELL'IL-1 E PARODONTITE CRONICA

Citterio F\*, Manavella V.\*, Vidal-Ribero H.<sup>°</sup>, Pulcini A.<sup>°</sup>, Romano F.\*, Aimetti M.\*

\*Dipartimento di Scienze Chirurgiche, C.I.R. Dental School, Sezione di Parodontologia, Università degli studi di Torino

<sup>°</sup>Universidad Complutense de Madrid, Departamiento de Periodoncia

### Riassunto

**Introduzione:** Gli studi che hanno analizzato l'associazione tra i polimorfismi dell'interleuchina-1 (IL-1) e la parodontite cronica hanno riportato risultati spesso contrastanti. L'obiettivo di questa revisione sistematica è valutare la qualità degli studi di associazione dei polimorfismi dei geni IL1A e IL1B e la parodontite in termini di metodologia scientifica e di reporting, per indagare quali fattori abbiano contribuito a generare risultati così contraddittori. **Materiali e Metodi:** Sono stati selezionati gli studi di tipo caso-controllo sull'associazione tra la parodontite cronica e i polimorfismi IL1A-889 e IL1B+3954. Due tabelle sono state predisposte per raccogliere le informazioni relative alla qualità del reporting dei dati e alla qualità della metodologia scientifica ed assegnare un punteggio ad ogni studio. **Risultati:** Dei 477 articoli identificati, sono stati selezionati 20 studi pertinenti. Per quanto riguarda la qualità del reporting il punteggio medio è stato di 13,05 +/- 2,60 punti su un massimo di 21 punti. In termini di metodologia il punteggio medio ottenuto è stato di 5,75 +/- 1,79 punti su un massimo di 14 punti. **Conclusioni:** la maggior parte degli studi pubblicati in letteratura presentano limiti in termini di qualità di reporting e di metodologia, inficiando la validità esterna e, dunque, la generalizzabilità di questi lavori.

### Introduzione

La parodontite è una malattia sistemica multifattoriale complessa (1) ad ampia diffusione nella popolazione adulta. Dati epidemiologici relativi alla sua prevalenza nel nord dell'Italia evidenziano che circa il 40% delle persone è affetta da parodontite severa (2). I meccanismi eziopatogenetici della parodontite non sono ancora stati del tutto chiariti: la suscettibilità dell'ospite ed, in particolare, la variabilità genetica interindividuale svolgerebbe un ruolo centrale (3). E' stato osservato che individui differenti rispondono in modo diverso a stimoli simili (4). Da un'analisi dell'espressione della malattia in coppie di gemelli emerge che circa il 50% delle differenze nelle manifestazioni cliniche della patologia possa essere spiegato dal patrimonio genetico dei soggetti in esame (5).

La parodontite è una malattia complessa poligenica in cui si ritiene che siano coinvolti tra 5 e 20 geni. Per studiarne la componente genetica si è fatto ricorso all'analisi dei polimorfismi. Essendo facilmente riconoscibili è, infatti, possibile determinare la differente distribuzione delle varianti polimorfiche di un gene tra pazienti sani e pazienti malati e identificare le varianti alleliche di un gene associate alla malattia studiata. Tuttavia, bisogna considerare che studi con questo disegno sperimentale possono dimostrare un'associazione tra un fattore (il polimorfismo) e una condizione (la malattia) senza arrivare a inferire una relazione di causa-effetto. Inoltre, la natura poligenica della parodontite fa sì che la presenza di un polimorfismo non sia discriminante per determinare la presenza della malattia: individui sani possono presentare nel proprio genoma un allele associato alla malattia senza soffrire di nessuna condizione patologica. Attualmente, non è chiaro quale sia il significato clinico dell'associazione polimorfismo-malattia. In presenza di un'associazione positiva, infatti, i risultati potrebbero essere interpretati in modi differenti (4):

- L'allele associato alla malattia potrebbe essere effettivamente quello che predispone alla malattia.
- L'allele associato alla malattia potrebbe essere in disequilibrio con il gene che predispone alla malattia.
- L'associazione è dovuta alla stratificazione della popolazione (eterogeneità genetica tra diverse etnie).
- L'associazione è spuria e dovuta ad errori metodologici.

La prima interpretazione è, di solito, quella che viene utilizzata quando sono eseguiti studi caso-controllo per analizzare l'associazione tra una malattia e un gene candidato. Per quanto riguarda la parodontite l'approccio del gene candidato ha individuato in particolare modo polimorfismi relativi alle citochine che hanno un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria innata e adattativa. La più analizzata in letteratura è la superfamiglia dell'interleuchina-1 (IL-1) composta da 11 proteine distinte, codificate da geni principalmente localizzati sul cromosoma 2 (Tabella 1), di cui le più studiate sono:

- IL-1 $\alpha$  (gene IL1A)
- IL-1 $\beta$  (gene IL1B)

Queste proteine regolano il riassorbimento osseo, la proliferazione dei fibroblasti e la migrazione di cellule infiammatorie ed immunitarie nei tessuti parodontali. Inoltre, modulano la sintesi della prostaglandina-E2 e delle metalloproteinasi della matrice e dei suoi agenti inibitori. Queste azioni conferiscono all'IL-1 la plausibilità biologica necessaria perché si consideri il suo gene come gene candidato negli studi di associazione con la parodontite. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) dei geni *IL1* più studiati in relazione con la parodontite sono:

- SNP in posizione *IL1A* -889 (in legame con +4845)
- SNP in posizione *IL1B* +3954 (a volte identificato anche come +3954 a causa di variazioni di nomenclatura).

L'attenzione verso questi SNP è aumentata dal 1997 quando Kornman et al. (6) osservarono per la prima volta un'associazione tra "genotipo composto" dell'IL-1 e aumentata severità della parodontite in pazienti caucasici non fumatori. Il "genotipo composto" veniva definito come la presenza contemporanea degli alleli polimorfici *IL1A*-899 e *IL1B*+3953. Contrariamente, Meisel et al. (7,8) hanno osservato che il "genotipo composto" del gene *IL1* si associava con la parodontite nei fumatori, mentre altri autori hanno osservato una ridotta prevalenza di questi polimorfismi in popolazioni non caucasiche (9). Inoltre, studi successivi hanno riportato risultati spesso contrastanti. Pertanto, anche se alcuni studi hanno fornito risultati promettenti, i polimorfismi dei geni *IL1* non possono ad oggi essere considerati fattori di rischio per l'inizio o la severità della parodontite. Diversi sono i fattori che potrebbero avere contribuito a risultati così eterogenei. Quelli più rilevanti potrebbero riguardare differenze nelle classificazioni delle malattie parodontali utilizzate nei differenti studi, mancanza di omogeneità nei criteri di selezione dei casi e dei controlli, la gestione statistica ed analitica dei fattori di rischio e la gestione dei campioni genetici prelevati dagli individui presi in esame.

Sulla base di queste considerazioni, obiettivo di questa revisione sistematica è valutare la qualità degli studi di associazione dei polimorfismi dei geni *IL1A* e *IL1B* e la parodontite in termini di metodologia scientifica e di reporting, per indagare quali fattori abbiano contribuito a generare risultati così contraddittori. Infine, ulteriore obiettivo è, alla luce dei limiti degli studi analizzati, fornire delle indicazioni per migliorare la ricerca futura in ambito genetico.

## **Materiali e Metodi**

### *Focused Question*

Il protocollo è stato elaborato seguendo la check list del "PRISMA" (Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis) statement (10) con l'obiettivo di rispondere alla seguente domanda: "Qual è la qualità in termini di reporting e di metodologia scientifica degli studi di associazione tra i polimorfismi dei geni dell'IL-1 e la parodontite cronica?"

### **Criteri di Inclusione**

Al fine di selezionare studi pertinenti sono stati applicati i seguenti criteri di inclusione:

- Studi di tipo caso-controllo che hanno analizzato pazienti affetti da parodontite cronica, in condizione di salute sistemica
- Studi in lingua italiana, inglese, spagnola
- Studi pubblicati su riviste con impact factor superiore a 2.0
- Studi che analizzano l'associazione tra parodontite cronica e almeno uno dei due seguenti polimorfismi:
  - SNP in posizione *IL1A* -889
  - SNP in posizione *IL1B* +3954

Gli studi in altre lingue sono stati esclusi per l'impossibilità di lettura da parte degli Autori. Sono stati inclusi solo studi con un disegno caso-controllo perché l'obiettivo di questa revisione sistematica è determinare la qualità di questo tipo di studi che sono ad oggi i più diffusi in ambito di ricerca genetica parodontale. Sono stati scelti solo gli studi che considerano i polimorfismi dei geni *IL1A* e *IL1B* perché sono quelli più studiati in associazione con la parodontite. Allo stesso modo sono stati selezionati solo gli studi pubblicati su riviste con impact factor superiore a 2.0, basandosi sull'ipotesi che la qualità degli studi pubblicati su queste riviste sia metodologicamente superiore, anche se questa scelta potrebbe rappresentare un limite di questa revisione.

### **Strategia della Ricerca**

La ricerca elettronica è stata effettuata su PubMed, fino a Dicembre 2015 incluso, utilizzando la seguente stringa di ricerca:

(polymorphism OR mutation OR variant) AND (IL-1 OR interleukin-1 OR IL-1 OR cytokine) AND (periodontitis OR periodontal disease OR periodontal condition\* OR periodontal health OR periodontosis OR periodontal breakdown OR periodontal destruction).

La ricerca è stata effettuata combinando termini MeSH e testo libero.

La ricerca manuale è stata effettuata sulle seguenti riviste da Gennaio 1997 a Ottobre 2015:

- Journal of Periodontology
- Journal of Periodontal Research
- Journal of Clinical Periodontology
- Journal of Dental Research

### **Selezione degli Studi**

La selezione degli studi è stata dapprima eseguita valutando titoli e abstract da parte di 2 revisori indipendenti (F.C. e V.M.). Per non escludere nessun lavoro potenzialmente rilevante gli articoli selezionati da un revisore e non dall'altro sono stati inclusi nella prima selezione e letti integralmente. La concordanza inter-revisore è stata valutata tramite k di Cohen.

I due revisori indipendentemente hanno poi letto integralmente gli articoli selezionati. L'esclusione di un articolo si basava sui criteri di inclusione prestabiliti. Eventuali discordanze sono state risolte da un terzo revisore (M.A.). La concordanza inter-revisore è stata calcolata tramite k di Cohen.

### **Estrapolazione dei Dati**

Due revisori (F.C. e V.M.) hanno estrapolato indipendentemente i dati, compilando un'apposita tabella riassuntiva (Tabella 2). Ogni eventuale disaccordo è stato discusso con un terzo revisore (M.A.). L'analisi si è incentrata sulla qualità degli studi inclusi in questa revisione. Come messo in evidenza da Kinane et al. (4) esistono vari fattori di confondimento che possono inficiare i risultati degli studi di associazione in ambito parodontale. Sono stati presi in esame i seguenti aspetti: la classificazione delle malattie e delle condizioni parodontali utilizzata, la malattia parodontale presa in esame, i criteri diagnostici utilizzati per identificare i casi, i polimorfismi analizzati, la numerosità campionaria, la condizione parodontale dei controlli, il paese di provenienza e l'etnia, l'esposizione a diversi fattori di rischio o determinanti di rischio dei casi e dei controlli, il metodo di analisi del DNA e di individuazione dei polimorfismi, il controllo dell'osservanza della legge di Hardy-Weinberg e le conclusioni principali tratte dagli Autori degli studi.

Due tabelle sono state predisposte per raccogliere le informazioni relative alla qualità del reporting dei dati (Tabella 3) e alla qualità della metodologia scientifica (Tabella 4), associando ad ogni risposta un punteggio. La prima, redatta sulla base delle indicazioni presenti nello "STROBE ("Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology") statement" (11), prende in esame aspetti relativi all'adeguatezza di titolo, abstract, introduzione, materiali e metodi, risultati e conclusioni (vedi Tabella 3). La tabella relativa alla qualità metodologica è stata elaborata prendendo in considerazione gli aspetti metodologici che gli studi di associazione tra parodontite e polimorfismi dovrebbero rispettare secondo Kinane et al. (4) (vedi Tabella 4). Infine, per ogni articolo sono stati assegnati un punteggio complessivo e un valore percentuale indicante la proporzione di criteri soddisfatti rispetto al totale. Lo stesso tipo di analisi è stata condotta per ogni criterio, indicando il numero e la percentuale di articoli che lo rispettavano.

## **Risultati**

### **Selezione degli studi**

La flow chart dello studio è riportata nella Figura 1. La ricerca su database elettronico ha selezionato 477 titoli. La ricerca manuale non ha individuato nessun articolo che non fosse già stato individuato dalla ricerca elettronica. La lettura dei titoli e degli abstract ha portato all'esclusione di 450 articoli. La concordanza inter-revisore è stata valutata "molto buona" ( $\kappa = 0,877$ ,  $SE = 0,029$ ; IC 95%: 0,819 - 0,934). Dei rimanenti 27 articoli è stato letto il testo integrale di 23. Quattro articoli non sono stati reperiti nel loro formato integrale. Dopo la lettura integrale del testo sono stati esclusi altri 3 articoli (12-14) con una concordanza inter-revisore del 100%. Al termine della selezione, 20 articoli sono stati inclusi nella revisione sistematica.

### **Analisi dei dati**

Una panoramica degli aspetti salienti degli studi revisionati è presentata nella Tabella 2. La valutazione della qualità in termini di reporting e di metodologia scientifica è riassunta nella Tabella 5. Per quanto riguarda la qualità della presentazione il punteggio massimo di 21 punti non è stato raggiunto da nessuno studio. In media il punteggio è stato di 13,05  $\pm$  2,60 punti. Lo studio migliore per la qualità del reporting è stato quello condotto da Tanaka et al. (15) con 19 punti. Il peggiore è stato quello di Galbraith et al (16) con 9 punti. In media gli studi analizzati hanno rispettato il 62,15% (SD: 12,37%) dei criteri per la valutazione della qualità in termini di presentazione dei risultati. In generale, la maggior parte degli studi ha descritto con chiarezza il razionale scientifico dello studio (100%) ed enunciato l'obiettivo della ricerca (95%). Va evidenziato che quasi sempre (95%) i risultati vengono adeguatamente sintetizzati per rispondere all'obiettivo dello studio. I maggiori limiti si riscontrano nel calcolo della potenza statistica, analizzato solo

in 3 studi (9,15,17), e nella descrizione dei potenziali fattori di confondimento, descritti solo nel 25% dei lavori presi in esame. Analogamente emerge una carenza di dati relativi alla distribuzione dei polimorfismi aggiustata per i principali fattori di confondimento, che sono stati forniti in 6 studi. Un limite evidente di quasi tutti gli studi, ad eccezione di uno (15), si riscontra nella mancanza di informazioni sul periodo di reclutamento dei soggetti presi in esame.

Per quanto riguarda, invece, la qualità metodologica degli studi, il punteggio medio ottenuto su un massimo di 14 punti è stato di 5,75 punti (SD: 1,79). In media gli studi analizzati rispettano il 41,08% +/- 12,75% dei criteri definiti importanti per garantire una buona qualità metodologica. Il punteggio massimo ottenuto è stato 9 punti, risultato raggiunto da 2 articoli (15,18). Il punteggio più basso è stato quello dello studio di Galbraith et al. (16) che ha ricevuto 2 punti. In termini di metodologia i limiti sembrano essere ancora più evidenti rispetto a quelli sottolineati dall'analisi della qualità del reporting. I limiti più evidenti riguardano il controllo dei possibili fattori di confondimento. Tra questi, il fumo di sigaretta è il fattore controllato più frequentemente (70%), mentre al limite opposto vi è lo stress che non è mai stato preso in considerazione (0%). Per quanto riguarda l'igiene orale solamente 4 studi su 20 sono riusciti a controllarne adeguatamente gli effetti (7,15,19,20). I due più importanti determinanti di rischio per la malattia parodontale, ovvero l'età e lo stato socio-economico, non sono stati spesso presi in considerazione. Infatti, solo il 50% e il 25% rispettivamente degli studi ne tengono conto in modo appropriato. Solo 4 studi controllano almeno 3 possibili fattori di rischio contemporaneamente (15,21-23). L'analisi dei grafici (Figura 1 e 2) dimostra un andamento casuale nel tempo per quanto riguarda la qualità del reporting, mentre evidenzia un trend temporale positivo per quanto riguarda la qualità metodologica, con gli articoli più recenti che raggiungono i punteggi più alti.

## Discussione

Gli studi esaminati in questa revisione presentano un certo livello di eterogeneità nella metodologia utilizzata che si riflette nei diversi punteggi ottenuti nella valutazione della qualità. In passato, a causa della variabilità metodologica osservata in questi studi, è stata messa in dubbio la possibilità di includere lavori simili in revisioni sistematiche o metanalisi. Ad ogni modo alcuni Autori hanno eseguito ugualmente analisi di questo tipo. Karimbux et al. (24) ad esempio, in una recente revisione sistematica, che includeva anche una meta-analisi effettuata su 13 lavori, ha dimostrato una debole associazione positiva tra i polimorfismi dei geni *IL1A* e *IL1B* e la parodontite cronica (OR = 1.48 e OR = 1.54 rispettivamente). L'eterogeneità tra i lavori presi in esame era significativa e potrebbe aver influito sui risultati ottenuti. La difficoltà di stabilire una associazione clinicamente e/o statisticamente significativa tra i polimorfismi del gene *IL1* e la parodontite potrebbe derivare da errori di metodologia. I risultati di questa revisione sistematica confermano i limiti metodologici dei lavori analizzati. In primo luogo la maggior parte degli studi non analizza correttamente i fattori di confondimento. Un fattore di confondimento si definisce come un fattore associato all'esposizione (in questo caso, la presenza del polimorfismo) e alla malattia (la parodontite), senza però essere un risultato dell'esposizione. In primo luogo il livello di igiene orale è un parametro che raramente è stato considerato negli studi presi in esame. Tuttavia, se gli individui del gruppo di controllo presentano un livello di igiene orale migliore in modo statisticamente significativo di quello degli individui del gruppo dei casi, bisogna chiedersi se i controlli sono realmente resistenti alla malattia e viceversa. In questo modo, una possibile allocazione sbagliata potrebbe mascherare i veri effetti del polimorfismo in esame. Inoltre, è anche importante tenere in considerazione le possibili interazioni epigenetiche tra il DNA dell'ospite e la flora batterica, aspetto considerato raramente negli studi revisionati.

Il ruolo del tabagismo come fattore di rischio parodontale è ampiamente dimostrato e la maggior parte degli studi ne tiene conto (6-8, 15, 18-21, 23, 25-29). Molti studi controllano il fattore "fumo" eseguendo l'analisi in gruppi "smoking-matched" o aggiustando i risultati in fase di analisi statistica. Altri studi infine hanno deciso di escludere i fumatori, giacché il rischio indotto dal fumo potrebbe mascherare gli effetti degli altri fattori presi in esame (6). Tuttavia, questa soluzione potrebbe non essere la più corretta, in quanto non permette di stabilire eventuali relazioni epigenetiche tra fumo di sigaretta e polimorfismi che, di fatto, sembrano avere un ruolo più che importante nel determinare il rischio parodontale. L'età e lo stato socio-economico sono determinanti di rischio, nel senso che aumentano le probabilità di essere stati esposti a veri fattori di rischio (30). Alcuni studi non ritengono necessario condurre un'analisi age-matched perché i pattern genetici non cambiano con l'età. Tuttavia, l'età è un determinante di rischio e se i controlli sono più giovani è plausibile che potrebbero essere ugualmente suscettibili pur non avendo ancora sviluppato la parodontite. In termine, invece, di stato socio-economico gli studi che utilizzano come controlli studenti universitari, dentisti o persone di ceti sociali più elevati, che hanno potuto usufruire di migliori cure

odontoiatriche nel corso della propria vita, potrebbero non evidenziare un'associazione tra i polimorfismi del gene *IL1* e la parodontite.

Nonostante buona parte degli studi utilizzi la classificazione delle malattie e delle condizioni parodontali del 1999 (17-19,21,31,32), questa potrebbe non essere la più adeguata per dimostrare la associazione tra parodontite e polimorfismi. E' infatti possibile che malattie con profili genetici diversi, ma con aspetti clinici simili siano raggruppate nella stessa categoria di questa classificazione. La selezione dei pazienti potrebbe identificare soggetti affetti da malattie con differenti profili genetici. Per evitare questo problema, come suggeriscono vari Autori (33,34), una strategia potrebbe essere l'inclusione unicamente di fenotipi severi che non si prestino ad incertezza di classificazione. Per questa ragione abbiamo valutato quanti degli studi presi in esame avessero utilizzato criteri diagnostici quantomeno paragonabili a quelli proposti da Page & Eke (35) per la parodontite severa. Tuttavia, solo 1 studio su 20 ha adottato criteri simili (6). Un altro aspetto che dovrebbe essere considerato, sulla base dei dati pubblicati originalmente da Kornman (6), è la correlazione tra i polimorfismi e la severità della patologia. Tra gli studi revisionati solo 8 hanno fornito dati di associazione stratificando per la severità della patologia (7,18,20,27,36) (6).

Un altro aspetto rilevante è il numero di polimorfismi investigati contemporaneamente. E' dimostrato che la parodontite è una malattia poligenica e che 5-20 geni sono coinvolti nel determinare la suscettibilità. Inoltre, è stato dimostrato che un'interazione di tipo gene-gene potrebbe influenzare l'attività dei singoli alleli (33). Questo significa che un allele polimorfico, benché presente, potrebbe necessitare di un secondo polimorfismo per essere attivato. Nella presente revisione è stato impossibile assegnare un punteggio relativo al numero di polimorfismi che dovrebbero essere indagati contemporaneamente, dato che mancano informazioni su come questa analisi dovrebbe essere condotta e sul numero adeguato di polimorfismi da studiare nello stesso momento.

Infine, nonostante la maggior parte degli studi analizzati abbiano utilizzato un numero campionario superiore a 100, solo 3 studi, di cui 2 condotti sulla stessa popolazione (8,15,23), hanno analizzato il genotipo di almeno 1000 individui. In ambito genetico per studiare l'effetto di un polimorfismo (che spesso si esercita come un effetto debole) sono necessari campioni ad elevatissima numerosità. Per ovviare alla mancanza di significatività sarebbe opportuno che gli studi ampliassero il numero campionario. A tale scopo potrebbe essere meglio eseguire studi multicentrici. Tuttavia, l'aumento del numero campionario permetterebbe di aumentare la precisione, ma non l'esattezza dell'analisi statistica. Per migliorare l'esattezza è imprescindibile controllare adeguatamente i fattori di confondimento.

Migliorare la qualità del reporting potrebbe facilitare in futuro il compito di chi volesse eseguire lavori di revisione sistematica o meta-analisi in ambito genetico. Gli studi analizzati rispettano in media solo il 62,15% dei criteri che abbiamo ritenuto importanti da seguire nella presentazione di questa tipologia di studi. Contrariamente a quanto osservato in ambito metodologico, per quanto riguarda il reporting non emerge un trend di miglioramento temporale anche se lo STROBE statement (11) è stato pubblicato nel 2007. Probabilmente è necessario diffondere nella comunità scientifica l'importanza di questi aspetti.

I principali limiti di questa revisione sistematica sono relativi al fatto che è stato considerato un unico database e la restrizione a tre lingue. Un lavoro parallelo sta analizzando gli studi che hanno osservato l'associazione tra i polimorfismi del gene *IL1* e la parodontite aggressiva.

### Conclusioni

In conclusione i risultati di questa revisione sistematica indicano che la maggior parte degli studi pubblicati in letteratura presentano limiti in termini di qualità la qualità di reporting e di metodologia scientifica. Questo inficia la validità esterna e, dunque, la generalizzabilità di questi lavori. Fino a quando non sarà disponibile un'evidenza scientifica basata su un maggiore rigore metodologico è difficile applicare i risultati ottenuti nella pratica clinica quotidiana.

### Bibliografia

- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet.* 2002 Apr 30;3(5):391–7.
- Aimetti M, Perotto S, Castiglione A, Mariani GM, Ferrarotti F, Romano F. Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in North Italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. *J Clin Periodontol.* 2015 Jun 25;42(7):622–31.
- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000. 1997 Jun;14:9–11.
- Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontology* 2000. 2005;39:91–117.



- Michalowicz BS, Aepli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, et al. Periodontal findings in adult twins. *Journal of Periodontology*. 1991 May;62(5):293–9.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997 Jan;24(1):72–7.
- Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2002 Jan;73(1):27–32.
- Meisel P, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, John U, Kocher T. Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2004 Feb;75(2):236–42.
- Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorrell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *Journal of Periodontology*. 2000 Feb;71(2):164–71.
- Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev. BioMed Central*; 2015;4(1):1.
- Vandembroucke JP, Elm von E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, et al. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Epidemiology*. 2007 Nov;18(6):805–35.
- Braosi APR, de Souza CM, Luczyszyn SM, Dirschnabel AJ, Claudino M, Olandoski M, et al. Analysis of IL1 gene polymorphisms and transcript levels in periodontal and chronic kidney disease. *Cytokine. Elsevier Ltd*; 2012 Oct 1;60(1):76–82.
- Struch F, Dau M, Schwahn C, Biffar R, Kocher T, Meisel P. Interleukin-1 Gene Polymorphism, Diabetes, and Periodontitis: Results From the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Journal of Periodontology*. 2008 Mar;79(3):501–7.
- Wu X, Offenbacher S, López NJ, Chen D, Wang HY, Rogus J, et al. Association of interleukin-1 gene variations with moderate to severe chronic periodontitis in multiple ethnicities. *J Periodontal Res*. 2014 Apr 2;50(1):52–61.
- Tanaka K, Miyake Y, Hanioka T, Arakawa M. Relationship between IL1 gene polymorphisms and periodontal disease in Japanese women. *DNA Cell Biol*. 2014 Apr;33(4):227–33.
- Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1999 Nov;26(11):705–9.
- Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, et al. Functional Gene Polymorphisms in Aggressive and Chronic Periodontitis. *Journal of Dental Research*. 2005 Dec 1;84(12):1149–53.
- Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res. Blackwell Publishing Ltd*; 2007 Feb;42(1):23–30.
- Shete AR, Joseph R, Vijayan NN, Srinivas L, Banerjee M. Association of single nucleotide gene polymorphism at interleukin-1beta +3954, -511, and -31 in chronic periodontitis and aggressive periodontitis in Dravidian ethnicity. *Journal of Periodontology*. 2010 Jan;81(1):62–9.
- 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):389–96.
- Moreira PR, de Sa AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, et al. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res. Munksgaard International Publishers*; 2005 Aug;40(4):306–11.
- Lopez NJ, Jara L, Valenzuela CY. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2005 Feb;76(2):234–43.
- Meisel P, Siegemund A, Grimm R, Herrmann FH, John U, Schwahn C, et al. The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study. *Journal of Dental Research*. 2003 Mar;82(3):189–93.
- Karimbux NY, Saraiya VM, Elangovan S, Allareddy V, Kinnunen T, Kornman KS, et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology*. 2012 Nov;83(11):1407–19.
- Ferreira SB, Trombone APF, Repeke CE, Cardoso CR, Martins W, Santos CF, et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infect Immun. American Society for Microbiology*; 2008 Aug;76(8):3725–34.
- Wagner J, Kaminski WE, Aslanidis C, Moder D, Hiller K-A, Christgau M, et al. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol. Blackwell Publishing Ltd*; 2007 Oct;34(10):823–7.



- Agrawal AA, Kapley A, Yeltiwar RK, Purohit HJ. Assessment of single nucleotide polymorphism at IL-1A+4845 and IL-1B+3954 as genetic susceptibility test for chronic periodontitis in Maharashtrian ethnicity. *Journal of Periodontology*. 2006 Sep;77(9):1515–21.
- Lopez NJ, Jara L, Valenzuela CY. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2005 Feb;76(2):234–43.
- Laine ML, Farré MA, González G, van Dijk LJ, Ham AJ, Winkel EG, et al. Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *Journal of Dental Research*. 2001 Aug;80(8):1695–9.
- Papapanou PN, Lindhe J, Sterrett JD, Eneroth L. Considerations on the contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. *J Clin Periodontol*. 1991 Sep;18(8):611–5.
- Zuccarello D, Bazzato MF, Ferlin A, Pengo M, Frigo AC, Favero G, et al. Role of familiarity versus interleukin-1 genes cluster polymorphisms in chronic periodontitis. *Gene*. 2014 Feb 10;535(2):286–9.
- Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol*. 2006 Nov;33(11):765–70.
- Scapoli C, Borzani I, Guarnelli ME, Mamolini E, Annunziata M, Guida L, et al. IL-1 Gene Cluster is Not Linked to Aggressive Periodontitis. *Journal of Dental Research*. 2010 Apr 15;89(5):457–61.
- Fiebig A, Jepsen S, Loos BG, Scholz C, Schäfer C, Rühling A, et al. Polymorphisms in the interleukin-1 (IL1) gene cluster are not associated with aggressive periodontitis in a large Caucasian population. *Genomics*. Elsevier Inc; 2008 Oct 10;:1–7.
- Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2007 Jul;78(7 Suppl):1387–99.
- Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998 Oct;25(10):781–5.

Riferimento

Filippo Citterio

E-mail: [filippocitterio89@gmail.com](mailto:filippocitterio89@gmail.com)