

Valutazione in vitro della risposta di cellule infiammatorie a Viti da Impianto con differenti superfici implantari

DR. FABIO COLOMBELLI
DR. MARCO MORRA
DR.SSA CLARA CASSINELLI
DR. DANIELE BOLLATI

RIASSUNTO

Lo scopo del lavoro è stata la valutazione della risposta infiammatoria in vitro a superfici implantari differenti sulla base dello stesso trattamento, per valutare quale fattore influenzasse lo sviluppo di tale risposta infiammatoria e quindi per analizzare un possibile fattore in vivo dello sviluppo di mucositi implantari o perimplantiti vere e proprie.

Sulla base del protocollo di riferimento utilizzato per il trattamento e l'analisi dei dati ottenuti, si ritiene di poter valutare che in vitro la risposta infiammatoria sia dipendente dalla presenza di endotossine sulle superfici implantari più che dalla topografia della superficie.

PAROLE CHIAVE

Perimplantite, endotossine, superficie, implantare, in vitro.

ABSTRACT

The purpose of the work was the evaluation of the inflammatory response in vitro to different implant surfaces on the basis of the same treatment, to assess which factor influenced the development of this inflammatory response, and then to analyze a possible factor in the development of in vivo implant mucositis or peri-implantitis.

On the basis of the reference protocol used for the treatment and analysis of the data obtained, it is believed that in vitro to assess the inflammatory response is dependent on the presence of endotoxins on implant surfaces rather than by the topography of the surface.

KEY WORDS

Perimplantitis, endotoxins, surface, implant, in vitro.

DR. FABIO COLOMBELLI
DR. MARCO MORRA
DR.SSA CLARA CASSINELLI
DR. DANIELE BOLLATI

1. INTRODUZIONE: il problema delle perimplantiti

La chirurgia implantare è sempre più utilizzata per la sostituzione di elementi dentali mancanti, per cui una percentuale crescente di individui risulta essere portatore di impianti osteointegrati. È però anche noto che una delle problematiche principali che affliggono l'impianto è l'insorgenza della perimplantite.

Le alterazioni patologiche a carico dei tessuti perimplantari si distinguono in base alla loro estensione in mucositi e perimplantiti.

Le mucositi perimplantari sono infiammazioni che interessano solo i tessuti molli, mentre le perimplantiti sono caratterizzate da un coinvolgimento patologico che va oltre la barriera mucosa e determina riassorbimento osseo.

I segni che caratterizzano questi quadri sono quelli tipici dell'infiammazione e quindi iperplasie gengivali, emorragia e infiltrato flogistico.

Sappiamo che ci può essere evoluzione con presenza di essudato purulento come dimostrato già nel 1994 da Mombelli e Lang.

Altri segni sono coni di riassorbimento perimplantare (Brägger 1994) e l'aumento della profondità di sondaggio.

Già nel 1989 Lindhe et al. hanno dimostrato che la microflora saprofita nel solco dei denti naturali è simile a quella che troviamo nel solco di impianti circondati da tessuto perimplantare sano e quindi da specie batteriche non mobili di aerobi Gram-positivi (Mombelli e Lang 1992).

In presenza invece di coni di riassorbimento come nelle perimplantiti troveremo nel solco perimplantare la presenza di anaerobi soprattutto Gram-negativi, di spirochete e bastoncelli (Mombelli et al. 1987).

Un controllo della placca batterica riduce la possibilità di patologia perimplantare in maniera analoga in quanto avviene nella malattia parodontale.

Risultano quindi fondamentali aspetti quali, la possibilità di avere un sigillo mucoso perimplantare che riduca la possibilità di progressione di una possibile alterazione a carico dei tessuti perimplantari e la valutazione che la diversa tipografia superficiale degli impianti possa influenzare lo sviluppo della perimplantite.

Sulla base di quest'ultimo aspetto parte l'analisi da noi eseguita.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del lavoro è infatti stata la valutazione, mediante analisi RT-PCR, della risposta di cellule

infiammatorie a viti da impianto in titanio provenienti da diversi fornitori e con diversa superficie.

In particolare, lo scopo è stato quello di misurare l'espressione, da parte di macrofagi in coltura, di alcuni geni-chiave coinvolti nel processo di infiammazione, utilizzando un protocollo in vitro sviluppato recentemente per analizzare la risposta infiammatoria a stimoli della superficie.

I nomi commerciali delle viti da impianto vengono omessi in quanto per il risultato del nostro lavoro la discriminante fondamentale risulta essere la diversa morfologia e struttura della superficie implantare, indicata nell'analisi delle viti-campione.

3. MATERIALI E METODI

I campioni valutati in questo lavoro sono stati i seguenti. La lettera indica un tipo di vite implantare e il numero il numero di campioni analizzati per quella stessa vite.

A1 Soadco KLOCKNER 3.8 x 14 2835 B 384 (SABBIATO E ACIDIFICATO)

A2 Soadco KLOCKNER 3.8 x 14 2835 B 384 (SABBIATO E ACIDIFICATO)

B Sweden & Martina KONHO 4.25 x 13 0000048718 (ACIDIFICAZIONE con Ossido di Zirconio)

C1 Implant Direct LEGACY 3.7 x 10 37052 (HA IDROSSIAPATITE RIVESTITO)

C2 Implant Direct LEGACY 3.7 x 10 44230 (HA IDROSSIAPATITE RIVESTITO)

D1 Prodent Italia PRIME 4.6 x 8.5 017013 (DOPPIA ACIDIFICAZIONE)

D2 Prodent Italia PRIME 4.6 x 8.5 017013 (DOPPIA ACIDIFICAZIONE)

E1 Bego SEMADOS 5.5 x 10 904351 (SABBIATO E ACIDIFICATO)

E2 Bego SEMADOS 5.5 x 10 904351 (SABBIATO E ACIDIFICATO)

F1 Zimmer TSVTB10 3.7 x 10 62176820 (SABBIATURA CON CRISTALLI IDROSSIAPATITE + rivestimentoHA)

F2 Zimmer TSVTB10 3.7 x 10 62176820 (SABBIATURA CON CRISTALLI IDROSSIAPATITE + rivestimentoHA)

F3 Zimmer TSVWH10 4.7 x 10 66218026 (SABBIATURA CON CRISTALLI IDROSSIAPATITE)

F4 Zimmer TSVWH10 4.7 x 10 66218026 (SABBIATURA CON CRISTALLI IDROSSIAPATITE)

G1 Geass WAY Milano 3.8 x 13 13P004140980000 (LASERIZZATO)

G2 Geass WAY Milano 3.8 x 13 13P004140980000 (LASERIZZATO)

G3 Geass WAY Milano 5.5 x 13 12P000853710000 (LASERIZZATO)

Tutti i campioni erano in confezione sigillata ed in condizioni di sterilità.

Le confezioni sono state aperte immediatamente prima del test, sotto una cappa a flusso laminare Faster BIO 48 (DASIT), nel nostro laboratorio di colture cellulari.

Non è stato possibile analizzare alcuni campioni perché non è stato possibile rimuovere il dispositivo di montaggio in maniera semplice (per questo sono indicati in tabella con sfondo grigio). Operazioni di rimozione “forzata” avrebbero potuto introdurre contaminazione e rendere il dato non affidabile.

Per valutare la risposta infiammatoria è stata eseguita una misura di espressione genica mediante RT-PCR. Le prove sono state eseguite mediante la valutazione dell'espressione da parte di macrofagi J774A-1 di alcuni geni-chiave della risposta infiammatoria in particolare, Interleuchina 1beta (IL-1beta) e interleuchina 6 (IL-6).

Il metodo analitico è stato il seguente: abbiamo recentemente dimostrato che l'espressione dei geni citati da parte della linea cellulare menzionata è, a breve tempo (4 h), controllata sostanzialmente dal livello di endotossine adese ed è indipendente dalla natura del materiale (J Oral Implantol. 2012 Nov 12. [Epub ahead of print], Adherent endotoxin on dental implant surfaces: a reappraisal, Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Bollati D, Bellanda M). Sulla base di questa osservazione, la quantità di endotossine adese e la risposta immediata infiammatoria possono essere misurate controllando la risposta trascrizionale di macrofagi J774A-1 a tempi brevi sulle superfici da analizzare.

Le misure sono state eseguite come segue: una sospensione di $1.35 \pm 0.18 \times 10^5$ cellule J774A-1, coltivate in terreno DMEM contenente L-glutamina (Gibco, INVITROGEN S.r.l), 20% Foetal Bovine Serum (FBS Gibco, INVITROGEN S.r.l), penicillina e streptomina (Gibco, INVITROGEN S.r.l) è stata introdotta in micropiastre a 12 pozzetti sterili in polistirene (12-well multiwell plates, Cell Star, Greiner One™), che contenevano i campioni.

L'analisi di espressione genica è stata condotta utilizzando real time reverse transcription PCR (qRT-PCR). L'RNA totale è stato estratto dopo 4 h, utilizzando il MagMax Total RNA Isolation Kit

(Applied Biosystems).

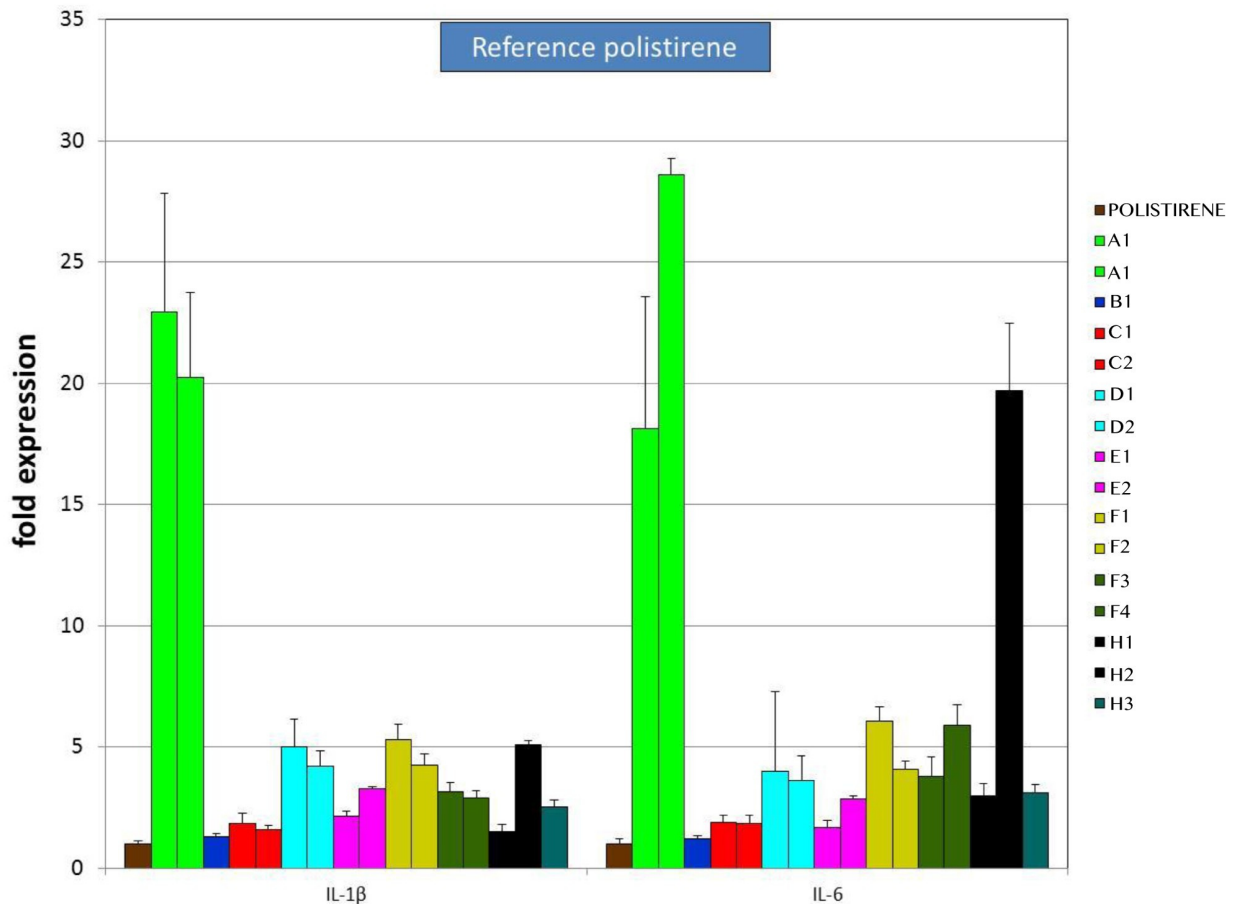
La qualità dell'RNA è stata valutata controllando che il rapporto A260/A280 fosse tra 1.6 e 2.0. L'RNA estratto è stato in seguito retro-trascritto per ottenere cDNA utilizzando l' Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription kit.

La quantificazione relativa dei geni è stata ottenuta utilizzando sonde Taq Man specifiche per ogni gene valutato e GAPDH come gene di riferimento. Per ogni tipologia sono stati utilizzati cinque campioni, ad eccezione del riferimento che era singolo. In questo caso, le reazioni di amplificazione sono state eseguite in triplicato da tre aliquote del medesimo campione, per poter valutare almeno l'accuratezza intraesperimento. L'amplificazione è stata condotta utilizzando un termociclatore StepOne (Applied Biosystems) secondo le istruzioni del produttore. I grafici di espressione genica sono stati ottenuti normalizzando i dati utilizzando il software StepOne, secondo il metodo standard ΔCt .

4. RISULTATI

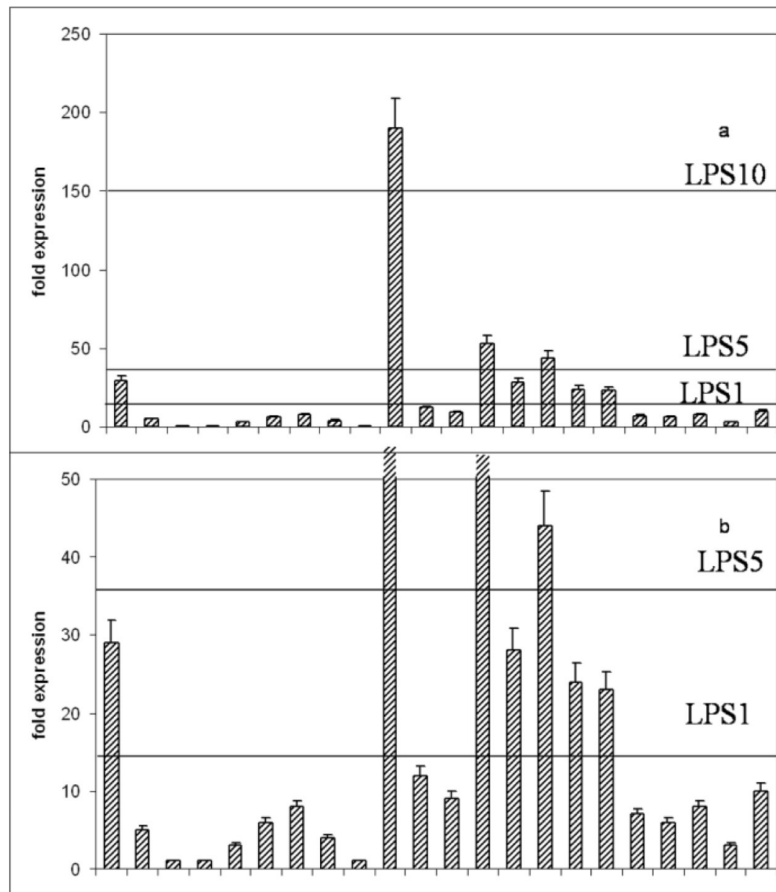
I risultati delle misure di espressione genica sono riportati nel grafico sottostante. In particolare, i dati mostrano quante volte è variata l'espressione di un dato gene rispetto a quanto misurato sul campione di riferimento, cioè il polistirene per colture cellulari utilizzato per la crescita delle cellule, a seguito del contatto tra cellule infiammatorie e superficie impiantare.

Per questo motivo, l'espressione misurata sul campione di riferimento e' sempre uguale a 1 (TABELLA 1).



Il grafico mette immediatamente in evidenza come i campioni Klockner prodotti da Soadco siamo decisamente piu' pro-infiammatori rispetto a tutti gli altri campioni. Infatti l'espressione delle due interleuchine e' maggiore di 20-30 volte rispetto a quanto avviene quando le cellule incontrano la superficie del riferimento o la superficie di alcuni degli impianti analizzati in questo esperimento.

I rimanenti impianti sono tutti mediamente buoni, in quanto la sovraespressione di geni infiammatori e' al massimo attorno alle 5 volte. Nella figura sottostante e' riportato quanto avevamo trovato nell'articolo citato, che e' alla base del metodo analitico adottato, e che evidenzia frequenti sovraespressioni anche di 20 volte e piu' dei geni in esame (nella figura si tratta di IL-6, che sulla base della nostra esperienza e' il gene con maggiore sensibilita' alla presenza di endotossine, quindi confrontabile con il grafico riportato nella parte destra del grafico dei risultati) (TABELLA 2).



Ritornando ai dati ottenuti, in un quadro generalmente buono, il campione KONHO e i campioni Legacy presentano risultati particolarmente brillanti, ma, in totale, le differenze sono limitate e i campioni valutati in generale, appaiono adeguati, come già descritto e con l'eccezione di Klockner. Qualche perplessità viene anche dai due campioni WAY 3.8 x 13, uno dei quali è decisamente peggiore dell'altro. Questo dato potrebbe indicare una non completa riproducibilità di processo di rimozione di endotossine. Questo dato indica anche come la eventuale presenza di endotossine in superficie giochi un ruolo più importante, nel promuovere una risposta infiammatoria, rispetto alla topografia superficiale, risultato in accordo con quanto riportato nell'articolo citato. Infatti i due campioni Way sono identici per topografia superficiale, mentre sono molto diversi, ad esempio, dalla topografia Prime. Eppure, la specificità della risposta biologica fa sì che uno di essi si comporti, sotto l'aspetto dell'espressione di IL, praticamente come Prime, mentre l'altro è del tutto diverso. In altre parole, a "comandare" la risposta infiammatoria, almeno in vitro e nell'ambito di questi tempi sperimentali, non è tanto la topografia quanto la presenza di endotossine adese.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, questi dati indicano che buona parte dei campioni analizzati sono sicuramente adeguati e realizzati con cura idonea all'applicazione, dal punto di vista del controllo delle endotossine adese. I campioni di viti da impianto Klockner sono decisamente peggiori rispetto

agli altri, e il comportamento dei campioni Way non e' molto riproducibile, l'espressione di IL-6 è buona in un caso, meno buona nell'altro.

Resta quindi importante il già citato riferimento alla maggior importanza della ridotta quantità di endotossine presenti sulle superfici implantari ancor prima che la morfologia delle superfici stesse.

Ovvero, ripetendo il concetto espresso poche righe fa, **a “comandare” la risposta infiammatoria, almeno in vitro e nell’ambito di questi tempi sperimentali, non é tanto la topografia della superficie quanto la presenza di endotossine adese alle superfici stesse.**

Per cui è fondamentale utilizzare impianti che presentino superfici le meno contaminate possibili e ciò è verificabile con diversi esami (vedi XPS).

Altrettanto fondamentale e da approfondire in ulteriori studi è invece la valutazione di utilizzare superfici che siano maggiormente predisposte rispetto ad altre alla formazione di sigillo mucoso che possa evitare la progressione di un'alterazione patologica a carico dei tessuti perimplantari.

BIBLIOGRAFIA

Mombelli A, Lang NP. Clinical Parameters for the Evaluation of Dental Implants. *Periodontology* 2000 4:81-86, 1994.

Brägger U. Maintenance, Monitoring, Therapy of Implant Failures. In: Lang NP, Karring T (eds). *Proceeding of the 1st European Workshop on Periodontology*. Quintessence Book, London (UK), 345-364, 1994.

Mombelli A, Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant infection. *Clin Oral Implants Res* 3:149-155, 1992.

Mombelli A, Van Oosten MAC, Schurch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 2:145-151, 1987.