

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA



Dipartimento di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Odontoiatria e Protesi Dentaria

*Presidente Prof. Alberto Verrotti di Pianella*

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

## **APPLICAZIONE DI NUOVI AGENTI STERILIZZANTI SU IMPIANTI PER IL TRATTAMENTO DELLA PERIMPLANTITE**

**Candidata**

Giulia Restani

**Relatore**

Prof. Gian Luca Mascolo

**Correlatore**

Prof. Silvia Bozza

Anno Accademico 2022-2023



*Alla mia famiglia*

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
<b>CAPITOLO I</b> .....	<b>8</b>
<b>1. IMPIANTO DENTALE</b> .....	<b>8</b>
1.1. <i>Cenni storici sulla storia dell'implantologia</i> .....	8
1.2. <i>Caratteristiche strutturali dell'impianto</i> .....	9
1.3. <i>Dente e impianto a confronto</i> .....	12
1.4. <i>Titanio</i> .....	14
1.5. <i>Controindicazioni all'inserimento implantare</i> .....	20
1.6. <i>Osteointegrazione</i> .....	21
1.7. <i>Tessuti perimplantari</i> .....	23
<b>CAPITOLO II</b> .....	<b>25</b>
<b>1. MALATTIE PERIMPLANTARI</b> .....	<b>25</b>
<b>2. EZIOPATOGENESI DELLA PERIMPLANTITE</b> .....	<b>27</b>
<b>3. FATTORI DI RISCHIO DELLA PERIMPLANTITE</b> .....	<b>31</b>
<b>4. DIAGNOSI DI PERIMPLANTITE</b> .....	<b>35</b>
4.1. <i>Diagnosi clinica</i> .....	35
4.2. <i>Diagnosi radiografica</i> .....	36
4.3. <i>Esami di laboratorio</i> .....	38
<b>5. TRATTAMENTO DELLA PERIMPLANTITE</b> .....	<b>39</b>
5.1. <i>Trattamento meccanico</i> .....	41
5.2. <i>Trattamento chimico</i> .....	43
5.3. <i>Trattamento fisico</i> .....	48
<b>SEZIONE SPERIMENTALE</b> .....	<b>50</b>
<b>CAPITOLO III</b> .....	<b>51</b>
<b>1. EC-STER</b> .....	<b>51</b>
<b>1. ARGENTO COLLOIDALE</b> .....	<b>53</b>
<b>2. ANALISI DI SUPERFICIE</b> .....	<b>57</b>
2.1. <i>Materiali e metodi</i> .....	57
2.2. <i>Microscopia a Scansione Elettronica (SEM)</i> .....	58
2.3. <i>Risultati</i> .....	59
2.4. <i>Discussione</i> .....	70
<b>3. TEST AD ATTIVITÀ ANTIMICROBICA</b> .....	<b>71</b>

<i>3.1. Materiali e metodi</i> .....	<b>71</b>
<i>3.2. Spettrometria di massa MALDI-TOF</i> .....	<b>78</b>
<i>3.3. Risultati</i> .....	<b>79</b>
<i>1.4. Discussione</i> .....	<b>89</b>
<b>CONCLUSIONI FINALI</b> .....	<b>92</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>93</b>

## INTRODUZIONE

Prima dell'avvento dell'implantologia, i casi di edentulia venivano risolti esclusivamente mediante l'impiego di protesi rimovibili o di protesi fisse su denti naturali. Queste scelte terapeutiche rappresentano ancora una buona soluzione, ma conferiscono delle qualità estetiche e funzionali inferiori rispetto alla riabilitazione implantare.

I portatori di protesi rimovibili, totali o parziali, sono generalmente poco soddisfatti del risultato ottenuto. La frequente perdita di ritenzione del dispositivo, lo scarso risultato estetico e il limitato ripristino della capacità masticatoria rendono questo metodo riabilitativo poco apprezzato.

La protesi fissa su denti naturali è, al contrario, più socialmente accettata ma la preparazione del dente richiede un'ampia asportazione di tessuto sano determinando un danno biologico non indifferente.

L'implantologia rappresenta una metodica diffusa e predicibile che ha permesso di superare gran parte dei limiti della terapia riabilitativa tradizionale, soddisfacendo le crescenti aspettative del paziente, sia dal punto di vista estetico che funzionale. Gli impianti sono stati usati per anni con la convinzione che potessero essere indicati per un trattamento definitivo.

Tuttavia con l'aumento del numero di pazienti trattati, sono state osservate delle complicanze che potrebbero portare alla perdita dell'impianto e che in un primo momento non erano emerse: le malattie perimplantari. Si tratta di quadri infiammatori che interessano i tessuti intorno all'impianto, il cui fattore eziologico principale consiste nella colonizzazione batterica. Sebbene la formazione del biofilm sulla superficie implantare sia un evento assolutamente fisiologico, in certe condizioni si può assistere ad un disequilibrio batterico che favorisce la proliferazione di specie batteriche patogene e l'insorgenza delle malattie perimplantari.

Descritte per la prima volta durante il Workshop Europeo di Parodontologia nel 1993, rappresentano ad oggi un reale problema medico. In particolare la comunità scientifica non è concorde nell'individuare un protocollo univoco per la gestione terapeutica della perimplantite. Da un lato infatti i trattamenti non chirurgici e chirurgici utilizzati non sono

sempre in grado di debellare la malattia e dall'altro, qualora ci riuscissero, spesso non riescono ad impedirne una recidiva.

Risulta pertanto complesso indicare quali strategie terapeutiche perseguire per la risoluzione di questa patologia e di conseguenza, sarebbe auspicabile testare nuovi metodi terapeutici e sostanze decontaminanti per poter trovare una cura efficace.

# CAPITOLO I

## 1. IMPIANTO DENTALE

### *1.1. Cenni storici sulla storia dell'implantologia*

La moderna implantologia è una branca relativamente recente.

Si è concordi nel ritenere che il padre dell'implantologia moderna fu Per-Ingvar Brånemark, appartenente alla Scuola svedese, in quanto per primo introdusse il principio biologico di osteointegrazione. Fu una scoperta rivoluzionaria per un'epoca in cui la chirurgia implantare era sempre stata concepita come una mera procedura meccanica.

In particolare Brånemark individuò dei criteri per raggiungere l'osteointegrazione degli impianti:

- Utilizzare dei materiali biocompatibili, come il titanio;
- Eseguire una tecnica chirurgica atraumatica e precisa nella realizzazione del sito implantare, così da ridurre lo spazio tra osso e impianto;
- Scegliere una fase di guarigione sommersa, riducendo il rischio di infezione e di carico precoce degli impianti.

Nel 1986 Albrektsson e i suoi collaboratori stabilirono i seguenti parametri per ottenere il successo implantare:

- Immobilità del singolo impianto, dopo la rimozione della mesostruttura;
- Assenza di radiotrasparenza perimplantare;
- Riassorbimento osseo perimplantare  $< 0,2\text{mm/anno}$  dopo il primo anno di carico;
- Assenza di infezione.

Con il termine percentuale di successo implantare si intende la percentuale di impianti che soddisfano i criteri sopra citati. È un concetto differente rispetto alla percentuale di sopravvivenza che corrisponde alla percentuale di impianti ancora in funzione, anche se non



soddisfano uno o più criteri. Entrambi i valori vengono valutati a cinque anni dall'inserimento implantare.

## *1.2. Caratteristiche strutturali dell'impianto*

L'impianto dentale è un dispositivo medico chirurgico che ha la funzione di sostituire la radice di uno o più elementi dentali mancanti, ripristinando la corretta masticazione, fonazione ed estetica del paziente. Permette la riabilitazione di arcate dentali totalmente o parzialmente edentule ed è ad oggi ritenuta una valida alternativa alla protesi fissa tradizionale.

In un impianto dentale possiamo riconoscere tre componenti: endossea, transmucosa e protesica.

La componente endossea (o fixture) non è altro che la vite implantare che viene inserita direttamente nell'osso ed è infatti interessata dal processo di osteointegrazione. Presenta una filettatura interna ed esterna, oltre a fori o scanalature, per aumentare la superficie di contatto. Distinguiamo macroscopicamente una forma tronco-conica (root-form) e una forma cilindrica. La forma tronco conica viene preferita nel carico immediato post estrattivo, perché possiede una forma simile a quella della radice e la conformazione dell'apice è meno soggetta al rischio di perforazione, essendo di dimensioni pari alla metà di quelle coronali.

La componente transmucosa (o abutment o moncone) è l'elemento intermedio che attraversa il tessuto gengivale la cui funzione consiste nel connettere la vite endossea alla protesi dentaria. Può essere parte integrante della fixture, formando un'unica struttura, oppure essere separata. Molto spesso si utilizzano dei monconi di diametro inferiore rispetto al collo dell'impianto, con lo scopo di diminuire la perdita ossea che si verifica dopo l'inserimento. Questa struttura, che prende il nome di platform switching, garantisce un buon supporto delle forze che vengono scomposte vettorialmente mantenendo così libero il colletto implantare. I batteri vengono in questo modo allontanati dall'osso crestale e dalla gengiva, diminuendo il rischio infettivo; inoltre la risposta dei tessuti molli viene aumentata portando alla formazione di un colletto di gengiva di volume sufficiente a garantire un'adeguata ampiezza biologica.

La componente protesica, anche conosciuta come corona, rappresenta la porzione in ceramica a contatto con l'ambiente orale e viene inserita sull'abutment. A seconda delle necessità e delle preferenze dell'operatore, la protesi può essere cementata o avvitata.

La protesi cementata ha delle qualità estetiche preferibili, rispetto alla protesi avvitata, in quanto non presenta un'apertura per l'inserimento della vite. Nonostante nell'avvitata venga apposto del materiale da ricostruzione per nascondere la vite, nel tempo può andare incontro alla formazione di pigmentazioni. Inoltre la protesi cementata non è soggetta a complicanze tipiche dell'avvitata, quali frattura e svitamento della vite. Un serraggio insufficiente o eccessivo infatti, comporta un progressivo svitamento della vite; in alcuni casi un serraggio eccessivo può addirittura provocarne la rottura. D'altro canto però, se il cemento in eccesso non viene correttamente rimosso, diventa un importante fattore di rischio per lo sviluppo della perimplantite, in quanto funge da mezzo di ritenzione per la placca batterica.

Per connessione si intende l'interfaccia abutment-impianto. Una connessione per essere definita ideale deve essere precisa, stabile e semplice. Possiamo avere diversi tipi di connessioni: esagonale, distinta a sua volta in esterna e interna, e conica.

Nella connessione esagonale, il pilastro viene avvitato all'impianto mediante una connessione a esagono esterno o interno anti-rotazionale. Nel caso di una connessione esterna l'elemento geometrico è localizzato a livello del collo dell'impianto, mentre in una connessione interna le pareti del collo dell'impianto sono inclinate verso l'interno.

In una connessione conica invece, l'abutment si innesta nel sito di alloggiamento mediante due parti protesiche, ovvero la parte "maschio" inserita dentro la parte "femmina". L'unione delle due componenti le rende inseparabili in quanto si realizza una cosiddetta "saldatura a freddo", favorita dalla presenza di una conicità del profilo dell'abutment di circa 4-5°.

Un impianto può essere distinto in base alle dimensioni: lunghezza e diametro. Per quanto concerne la lunghezza, gli impianti possono essere corti (<7mm), di media lunghezza o lunghi. In generale la lunghezza può variare tra i 6 e i 15mm, mentre il diametro oscilla tra 3 e i 5mm. Ovviamente la scelta dell'impianto dipende da diversi fattori:

- quantità e qualità dell'osso;
- rapporto corona-radice;
- condizioni cliniche del paziente;
- numero di impianti posizionati.

Gli impianti possono essere anche classificati in base alla modalità con cui vengono inseriti nell'osso (Chiapasco, 2021):

- Impianti a due componenti (o bifasici): detti anche “bone level”. In questo caso l'impianto viene sommerso completamente a livello della cresta ossea e, dopo aver atteso 2 mesi in mandibola e 3 mesi in mascella, si scopre e si sostituisce la vite di copertura (cover screw) con la vite di guarigione. Questa tecnica viene definita two stage in quanto sono previste due fasi chirurgiche. Gli impianti a due componenti sono preferibili quando inseriti contestualmente a tecniche rigenerative o nelle zone estetiche, poiché permettono di sfruttare al meglio la gengiva aderente disponibile. In passato, la presenza di un micro-gap tra impianto e componente trans-mucosa predisponeva all'accumulo di batteri, determinando il riassorbimento osseo fino alla prima spira dell'impianto. Questo problema è stato in gran parte risolto con l'introduzione del platform-switching;
- Impianti monocomponente (o monofasici): anche conosciuti come impianti “tissue level”, vengono posizionati a livello della gengiva con una parte inserita nell'osso. È prevista una sola fase chirurgica (one stage), contraddistinta dal contestuale inserimento dell'impianto e del pilastro di guarigione (healing screw), quest'ultimo posizionato sulla fixture. Oltre a limitare il disagio del paziente, questa metodica garantisce una rapida guarigione dei tessuti molli con formazione di un sigillo mucoso. Sono tuttavia evidenti alcune complicanze connesse, quali la retrazione gengivale o la deiscenza, che determinano a loro volta delle alterazioni di tipo estetico. Questa tecnica trova indicazione soprattutto nei settori latero-posteriori dei mascellari, dove è presente un'adeguata quantità ossea, e nei pazienti con storia di malattia parodontale. Negli impianti monofasici il micro-gap tra componente endosseica e trans-mucosa risulta essere assente.

È infine possibile elencare tre modalità di carico della protesi sugli impianti dentali, distinte in base al tempo di attesa (Chiapasco, 2021):

- Impianti a carico immediato: la protesi viene posizionata entro le 24/48 ore successive all'inserimento implantare, esponendo quindi l'impianto alle forze occlusali. Ovviamente vanno rispettati alcuni parametri, quali il controllo del carico occlusale che non deve determinare micromovimenti implantari superiori ai 100-

150µm, la quantità e la qualità ossea devono essere sufficienti e la stabilità primaria deve essere ottima;

- Impianti a carico precoce: il tempo di attesa per connettere la protesi con l'impianto corrisponde a circa 6-8 settimane dopo l'inserimento implantare, in maniera indipendente dalla sede anatomica;
- Impianti a carico differito: in questo caso la protesi può essere posizionata dopo un periodo di guarigione di 2-3 mesi. Ad oggi si consiglia questa modalità nei casi a rischio, in particolare quando la densità ossea è scarsa.

### 1.3. Dente e impianto a confronto

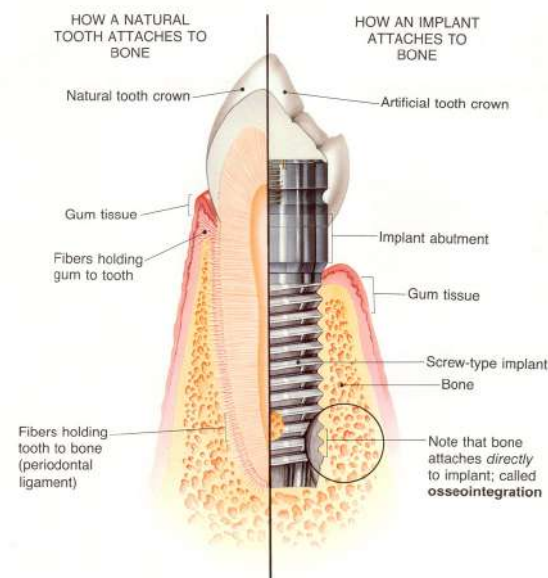


Figura 1 Schematizzazione di come l'osso si rapporta con un dente naturale e un impianto.  
(<https://www.ccdental.com.au/osseointegration>)

La grande distinzione che intercorre comparando un dente naturale ad un impianto dentale è la presenza del legamento parodontale. È un tessuto connettivo molle e cellulare, altamente vascolarizzato, composto principalmente da fibre collagene ordinate in fasci. L'elemento dentale è ancorato all'osso mediante questa struttura, mentre l'impianto si trova a diretto contatto con l'osso.

L'importanza del legamento parodontale per l'apparato stomatognatico è rilevante da vari punti di vista.

In primo luogo, funge da ammortizzatore delle forze masticatorie. Essendo formato da tessuto connettivo composto da fibre collagene orientate diversamente tra loro, attutisce le forze applicate durante la funzione masticatoria e conferisce elasticità all'intero complesso di masticazione.

In secondo luogo, stimola il rimodellamento osseo come risposta all'eccessive forze meccaniche applicate, permettendo all'osso di nuova formazione di essere adatto a sopportare i carichi masticatori.

In terzo luogo, assicura la ricezione sensoriale durante la masticazione. Nel dente naturale i meccanocefftori, sensibili agli stimoli meccanici esterni, sono collocati principalmente nel legamento parodontale. Un numero inferiore è poi situato tra gengiva, osso mascellare e periostio. Il legamento parodontale contiene numerose terminazioni nervose, in particolare quelle di tipo Ruffini. Quest'ultime sono presenti soprattutto nella porzione apicale del legamento parodontale e sono a stretto contatto con le fibre collagene dei tessuti circostanti. La precisa segnalazione delle informazioni carpite dai meccanocefftori arriva ai settori corticali, viene analizzata e rielaborata per ottimare la sequenza masticatoria (Trullson, 2006). Infatti consente non solo di dosare correttamente le forze che possono essere molto elevate in base alle necessità, ma anche di regolare in modo automatico la velocità di masticazione. Quando i denti vengono estratti, il legamento parodontale viene riassorbito e di conseguenza viene persa la percezione sensoriale. Si rivela quindi fondamentale una buona resistenza elastica dell'osso poiché è l'unica superficie con cui l'impianto si interfaccia. Infatti le forze applicate sugli impianti vengono trasferite all'osso, dove si attivano alcuni recettori, oltre a quelli contenuti nel periostio, nella cute e nei muscoli. Nonostante questo fenomeno, definito "osteopercezione", permetta un minimo di ripristino di funzione, vi è comunque un'incompleta capacità di avvertire tutti gli stimoli occlusali. Questo fattore rappresenta uno svantaggio poiché risulta alterato il meccanismo di difesa in risposta all'eccesso di sollecitazioni meccaniche.

Nella mucosa perimplantare la vascolarizzazione del plesso vascolare del legamento è assente e di conseguenza l'apporto ematico è esclusivamente a carico del plesso sovraperiostale che irrorà l'epitelio orale e giunzionale.

In seguito alla perdita di un elemento dentale, oltre al legamento parodontale, manca anche il cemento. L'assenza di entrambe le strutture comporta un'anchilosi funzionale dell'impianto nel momento in cui viene inserito. In aggiunta si modifica l'orientamento delle

fibre estrinseche dento-gengivali e dento-periostali. Infatti se nella mucosa intorno all'elemento dentale sono perpendicolari alla superficie del dente, nella mucosa perimplantare sono parallele all'impianto.

#### 1.4. Titanio

Il titanio è il biomateriale per eccellenza utilizzato per la realizzazione degli impianti dentali, come titanio commercialmente puro o lega. È collocato nel IV periodo della tavola periodica e appartiene ai metalli di transizione.

Fu scoperto per la prima volta da W. Gregor nel 1791, ma identificato solo qualche anno dopo da M.H. Klaproth. Dopo le scoperte di Hunter e Kroll del XX secolo, fu possibile ottenere il titanio in forma pura e successivamente Brånemark e i suoi collaboratori portarono alla comprensione del concetto di osteointegrazione e della capacità del titanio di essere osteointegrabile nei tessuti.

<b>Proprietà meccaniche</b>	<b>Valori</b>
Temperatura di Fusione	1668°C
Modulo di Young	10850N/mm <sup>2</sup>
Modulo di Elasticità a 25°C	100-110GPa
Punto di Snervamento	200-480MPa
Massima Resistenza alla Trazione	275-550MPa
Allungamento (Duttività)	10%

*Figura 2 Misure indicative di alcune proprietà meccaniche del titanio. (Spoto G. et al, Materiali e tecnologie odontostomatologiche)*

Il titanio è un metallo leggero, lucido e duttile, con una colorazione bianco-argentea. È dotato di un basso volume atomico e ionico e di un'elevata stabilità elettrochimica. Inoltre tra le sue proprietà fisiche, possiede buoni valori di rigidità e tenacità, bassa densità, basso modulo di elasticità, bassa conducibilità termica, bassa espansione termica. È in grado di sopportare

temperature estremamente elevate senza fondere e si distingue per l'elevata resistenza meccanica rappresentata da un'ottima risposta agli stress e alla corrosione.

Inoltre il titanio eccelle rispetto agli altri metalli per l'eccezionale biocompatibilità con il corpo umano, caratterizzata da una risposta positiva in termini di adesione e dalla proliferazione dei fibroblasti e degli osteoblasti sulla superficie. Infine è insolubile e non trasportabile, di conseguenza è in grado di resistere all'azione dei fluidi corporei impedendo lo sviluppo di una reazione immunitaria.

È un elemento allotropico, ovvero può esistere in più forme cristalline. A temperatura ambiente cristallizza con atomi disposti in una struttura esagonale compatta (EC), detta anche fase  $\alpha$ , mentre quando viene riscaldato a una temperatura superiore a  $883^{\circ}\text{C}$  cristallizza in fase cubica a corpo centrato (CCC), altrimenti detta fase  $\beta$ . Si tratta di una reazione di trasformazione reversibile.

Il titanio può essere commercializzato come titanio puro ( $\text{Ti} > 99.9\%$ ) oppure presentare delle impurità di superficie che possono modificare la temperatura  $\beta$ -transus, che corrisponde alla più bassa possibile in cui si può avere la presenza della sola fase  $\beta$ .

Tali impurità di superficie possono essere suddivise in tre gruppi, a seconda dell'effetto che esercitano sulla temperatura  $\beta$ -transus:

- Gli elementi  $\alpha$  stabilizzanti (come alluminio, ossigeno, azoto e carbonio) stabilizzano la fase alfa aumentando la temperatura di transizione di fase;
- Gli elementi  $\beta$  stabilizzanti (come vanadio, ferro, cromo e nichel) diminuiscono la temperatura di transizione di fase stabilizzando la fase beta;
- Gli elementi neutrali non influiscono sulla temperatura di transizione.

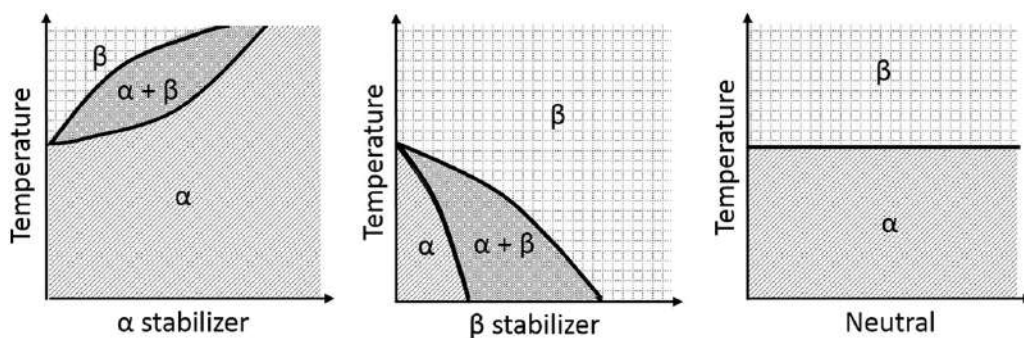


Figura 3 Diagrammi di fase del titanio. (Cordeiro, 2017)

Le leghe in titanio vengono raggruppate in classi distinte dalla composizione della microstruttura a temperatura ambiente, ottenuta dopo la lavorazione del metallo:

- Le leghe  $\alpha$  possiedono una percentuale di fase  $\beta$  inferiore al 5%;
- Le leghe near- $\alpha$  e  $\alpha + \beta$  hanno una percentuale di fase  $\beta$  compresa tra il 10 e il 20%;
- Le leghe  $\beta$  e near- $\beta$  presentano una percentuale maggiore di elementi  $\beta$  stabilizzanti (superiore al 20%).

Industrialmente il titanio è classificato in gradi. Secondo la classificazione della ASTM (American Society for Testing Materials) possono essere distinti circa 40 gradi, di cui i primi quattro sono di titanio commercialmente puro (cpTi).

I primi impianti Brånemark erano realizzati in titanio commercialmente puro di grado 1, particolarmente morbido e duttile con buona resistenza alla corrosione. Attualmente però non trova più applicazione in ambito odontoiatrico. Infatti gli impianti successivi sono stati realizzati in titanio commercialmente puro di grado superiore per migliorare le proprietà meccaniche e biologiche.

Il titanio di grado 4 è molto utilizzato per via dell'elevata resistenza alla corrosione che lo caratterizza, conferita dalla presenza di uno strato di ossido superficiale (ossigeno al 4%). Sebbene sia definito come titanio commercialmente puro presenta delle tracce di ferro e idrogeno. È inoltre biocompatibile e ha un modulo elastico relativamente basso. Tuttavia, possiede una resistenza alla fatica che diminuisce in aree soggette a usura e affaticamento.

Per risolvere questo problema, sono state introdotte delle leghe in titanio che contengono oltre ad una miscela di titanio anche altri elementi chimici, con lo scopo di migliorare le proprietà meccaniche dell'impianto, in particolare la resistenza alla fatica. Le leghe di titanio più utilizzate in campo implantare sono in titanio di grado 23 (Extra Low Interstitial, o ELI) e di grado 5, o Ti6Al4V. Entrambe le leghe incorporano circa il 90% di titanio, il 6% di alluminio e il 4% di vanadio. Sono leghe  $\alpha + \beta$ , ovvero contengono gli elementi stabilizzanti alfa (ossigeno e vanadio) e beta (vanadio). La presenza dell'alluminio aumenta la durezza e il modulo di elasticità e, in combinazione con il vanadio, riduce la conduttività termica e aumenta la resistenza all'usura. Ciò che differisce tra Ti6Al4V ELI e Ti6Al4V è la percentuale delle componenti interstiziali (ferro, ossigeno e carbonio) che risulta ridotta nel primo tipo.



È stato dimostrato che la lega Ti6Al4V ha tempi di osteointegrazione più lunghi rispetto agli impianti realizzati in titanio di grado 4, ma allo stesso tempo è caratterizzata da una maggiore resistenza e minor duttilità, conferite dalle impurità della lega. Generalmente trova impiego per la realizzazione di impianti di piccole dimensioni e il suo utilizzo è sconsigliato nel carico immediato. L'impiego della lega Ti6Al4V è stato largamente discusso (Catalani, 2013) (Passi, 2002). Dalla Letteratura emerge che possa avere un effetto negativo sulla vitalità cellulare, rispetto al titanio commercialmente puro, determinando potenziali reazioni tossiche, allergiche o cancerogene. La causa sembra essere dovuta al rilascio degli ioni incorporati nella lega, ovvero alluminio e vanadio, nei fluidi corporei. Questo fenomeno sembra incrementare in corso di tribocorrosione, ovvero l'azione simultanea di corrosione e usura. In particolare il vanadio è stato riscontrato nelle urine e nel sangue di alcuni pazienti, dove è stata impiegata questa lega, determinando una compromissione della maturazione cellulare e innescando dei cambiamenti morfologici negli osteoblasti. Come conseguenza si assiste ad un'alterazione della capacità degli osteoblasti di aderire sulla superficie, compromettendo l'osteointegrazione. L'alluminio, invece, comporta una modifica nella mineralizzazione della matrice extracellulare e nell'espressione genica dell'osteocalcina. Inoltre la sua presenza è associata a disturbi neurologici, quali il morbo di Alzheimer (Kim, 2019) (Kunrath, 2021) (Tardelli, 2021). Pertanto si è cercato di migliorare la biocompatibilità e l'osteointegrazione con i tessuti attraverso la realizzazione della lega di grado 23.

È stata poi confrontata la capacità della lega Ti6Al4v e del cpTi di ancorarsi all'osso. La Letteratura non è concorde nel concludere quale delle due forme possa essere migliore. Infatti sono emersi pareri discordanti. Da alcuni studi condotti su animali è stato evidenziato che gli impianti fabbricati in titanio commercialmente puro risultano più stabili e integrati nell'osso rispetto a quelli realizzati in Ti6Al4V (Stenport, 2008). Altri studi invece sottolineano la presenza di una BIC e di un livello di ancoraggio biomeccanico leggermente aumentati a favore di cpTi, seppur con una differenza non significativa (Shah, 2016). Sono pertanto necessari ulteriori indagini per raggiungere un parere univoco a riguardo.

Il processo di Kroll (1936) è la metodica più utilizzata per ricavare il titanio. Prevede l'estrazione del biomateriale da diversi minerali come il rutilo, che contiene il 93-96% di biossido di titanio, e l'ilmenite, che ne contiene il 44-70%. Durante questo procedimento il metallo viene sottoposto a clorurazione a 800° C così da convertire il biossido di titanio in tetracloruro di titanio. Successivamente verrà ridotto in titanio elementare in presenza di magnesio in atmosfera di gas inerte, previa purificazione per distillazione. Si ottiene così

una superficie dall'aspetto poroso e spugnoso che verrà rifusa per ottenere un lingotto di titanio commercialmente puro. L'aggiunta di altri elementi metallici quali alluminio, vanadio, cromo, niobio porta alla formazione delle leghe in titanio. Successivamente il titanio e le leghe ottenute vengono sottoposti a trattamenti termici di diverso tipo per incrementare le proprietà meccaniche e determinare la microstruttura specifica.

Per favorire una buona osteointegrazione è necessario che l'impianto dentale possieda determinate proprietà. Oltre a quelle meccaniche, un ruolo di rilievo è esercitato dalle caratteristiche della superficie.

Queste proprietà sono strettamente associate alla presenza di uno strato inerte di ossido di titanio che si viene a formare sulla superficie implantare quando è esposta all'ambiente esterno. Infatti, essendo il titanio un metallo particolarmente reattivo, in presenza di ossigeno stimola la strutturazione spontanea di ossido superficiale passivo. È costituito principalmente da biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>) con uno spessore variabile di circa 2-6nm. Rappresenta la zona di interfaccia tra impianto e tessuto e sono, pertanto, le proprietà superficiali di questo strato di ossido a condizionare l'interazione primaria tra impianto e ambiente biologico. Questo film protettivo possiede una buona stabilità chimica, oltre ad esercitare un'azione protettiva verso gli attacchi biologici. Inoltre garantisce una buona resistenza alla corrosione, riduce il rilascio di particelle di titanio e incrementa la biocompatibilità (Kirmanidou, 2016).

Le caratteristiche topografiche di superficie sono strettamente dipendenti dal metodo di lavorazione a cui l'impianto viene sottoposto, ovvero può essere macchinato o lavorato. Sufficienti evidenze scientifiche hanno concluso che una superficie microporosa degli impianti stimola l'azione degli osteoblasti e incentiva la deposizione delle componenti della matrice, favorendo così una massiccia osteointegrazione attraverso l'aumento della superficie di contatto osso-impianto (Cochran, 1999). Al contrario, una superficie macchinata presenta sia una minore stabilità implantare sia una percentuale di BIC inferiore e non è pertanto ritenuta la tecnica di scelta primaria. Allo stesso tempo però presenta un rischio inferiore di essere contaminata rispetto ad un impianto con superficie trattata.

Gli impianti a superficie liscia si ottengono mediante tornitura dell'impianto senza subire successivamente ulteriori trattamenti. Sebbene siano stati i primi ad essere impiegati, sono ad oggi caduti in disuso a favore degli impianti con superficie lavorata.

Per ottenere una superficie microporosa dell'impianto possono essere eseguiti dei processi di finitura superficiale che prevedono l'applicazione di tecniche sottrattive, additive o combinate.

Le tecniche sottrattive sono attualmente le più utilizzate. Le principali sono la sabbiatura, la mordenzatura con acidi e la combinazione di queste due metodiche.

La sabbiatura dell'impianto è una tecnica meccanica, la quale consiste nell'erogazione di un getto di grani abrasivi ad alta pressione sulla superficie in titanio che aumentano le irregolarità di superficie dell'impianto. Le particelle sono generalmente di 60-90 micron di diametro e sono costituite da biossido di titanio ( $TiO_2$ ) o triossido di alluminio ( $Al_2O_3$ ). In particolare è stato dimostrato che l'impiego di particelle di biossido di titanio comporta un miglioramento significativo nel contatto osso-impianto (BIC).

La mordenzatura con acidi è una tecnica chimica che prevede l'immersione dell'impianto per alcuni minuti in soluzione di acidi forti, principalmente acido nitrico ( $HNO_3$ ). Si determina così la formazione di micro-fosse di dimensioni variabili sulla superficie in titanio. La dimensione di queste formazioni crateriformi è in funzione del tempo di immersione, della concentrazione della soluzione e della temperatura.

Spesso la sabbiatura e la mordenzatura con acidi vengono utilizzate in modo combinato (SLA). Il primo passaggio consiste nel sottoporre la superficie implantare a sabbiatura con grana grossa, a cui segue una mordenzatura acida per alcuni minuti. La topografia ottenuta è ideale per promuovere l'adesione delle proteine e delle cellule nelle fasi iniziali della guarigione ossea.

Esistono altri processi di cui ci si può avvalere nelle tecniche sottrattive, seppur raramente: l'elettroerosione e l'ossidazione in bagno galvanico.

Gli impianti microrugosi ottenuti per addizione di materiale, al contrario, prevedono l'aggiunta di un materiale sulla superficie, sparato ad alta temperatura. Alcuni esempi di tecniche additive: impianti plasma spray rivestiti di particelle di titanio (Titanium Plasma Spray o TPS) o applicazione di uno spessore di idrossiapatite o calcio fosfato sulla superficie implantare.

La prima tecnica prevede una spruzzatura di polveri di titanio puro ad alta temperatura sulla superficie implantare. Si viene a formare così uno strato dato dalla condensazione della polvere di titanio sull'impianto.

La seconda procedura invece è caratterizzata dall'arricchimento della superficie con uno spessore consistente di idrossiapatite o calcio fosfato.

Oggi le tecniche additive vengono poco usate poiché, sebbene conferiscano rugosità alla superficie, presentano un rischio aumentato di distacco del materiale addizionato dall'impianto. Principalmente il rischio cresce all'aumento dei carichi a cui viene sottoposta quella determinata area trattata. Queste particelle possono diffondere nei tessuti adiacenti, causando una flogosi da corpo estraneo all'interfaccia con l'impianto. Come risultato, invece di facilitare l'osteointegrazione, determina una fibrointegrazione con successivo fallimento implantare.

### *1.5. Controindicazioni all'inserimento implantare*

La terapia implantare non può essere proposta in modo indiscriminato a tutti i pazienti che necessitano di una riabilitazione protesica. Esistono delle controindicazioni relative e assolute all'inserimento implantare che devono essere necessariamente considerate. Pertanto emerge come un'attenta anamnesi sia imprescindibile ai fini della pianificazione del trattamento.

Le controindicazioni relative, locali o sistemiche, abbassano la predicibilità del successo implantare e pertanto rendono temporaneamente sconsigliabile la riabilitazione su impianti.

Tra le controindicazioni relative si elencano:

- Pazienti con diabete scompensato
- Pazienti con ipertensione non controllata
- Pazienti con malattie cardiovascolari controllate (angina stabile, storia di infarto)
- Pazienti fumatori (oltre 10 sigarette al giorno)
- Pazienti con dipendenza da alcol o droghe
- Pazienti affetti da malattia parodontale attiva
- Pazienti con patologie orali (pemfigo, lichen planus)
- Pazienti con storia di endocardite infettiva o patologie valvolari
- Pazienti affetti da osteoporosi
- Pazienti con disturbi della coagulazione

- Pazienti che hanno subito una precedente radioterapia del distretto testa-collo prima di 6 mesi

Particolare attenzione va riservata ai pazienti in cui si riscontra una delle seguenti controindicazioni assolute, in quanto rappresentano un rischio troppo elevato di insuccesso implantare, oltre a compromettere lo stato di salute:

- Pazienti affetti da Morbo di Paget
- Pazienti in trattamento con bifosfonati o farmaci anti-riassorbitivi
- Pazienti oncologici fortemente debilitati
- Pazienti con coagulopatie gravi
- Pazienti con angina instabile, valvulopatie gravi, cardiopatie, cardiomiopatie o che abbiano avuto un infarto negli ultimi 6 mesi
- Pazienti affetti da insufficienza renale o epatica in stadi avanzati
- Pazienti con immunodeficienza grave (AIDS, trapianto di organi)

### *1.6. Osteointegrazione*

Il concetto di osteointegrazione venne per la prima volta introdotto da Brånemark e fu definito da Albrektsson come “una connessione diretta, funzionale e strutturale, tra l’osso vivo e la superficie di un impianto caricato”. Successivamente Schroeder e coll. dimostrarono la presenza di un reale contatto tra la superficie implantare e il tessuto osseo e lo denominarono “anchilosi funzionale”. Secondo questa definizione l’inserimento implantare doveva essere atraumatico e garantire una buona stabilità primaria. Possiamo dunque concludere definendo l’osteointegrazione come un contatto diretto e stabile tra osso e impianto, senza interposizione di mucosa.

Affinché questo processo biologico avvenga con successo, è fondamentale che l’impianto inserito nell’osso raggiunga la stabilità primaria in prima fase chirurgica e in seguito la stabilità secondaria.

Per stabilità primaria si intende la stabilità meccanica che un impianto acquisisce nel momento in cui viene inserito nell’osso. È fondamentale in quanto costituisce la base dell’osteointegrazione ed evita che si verifichino dei micromovimenti tali da causare una

fibrointegrazione intorno all'impianto per deposizione di tessuto fibroso. La stabilità primaria dipende dall'entità della frizione meccanica, derivante dall'interazione delle spire dell'impianto con l'osso. Di conseguenza, saranno rilevanti la morfologia e la macrostruttura dell'impianto, la tecnica chirurgica implantare scelta e la qualità dell'osso dove verrà inserito l'impianto.

La stabilità secondaria invece è la stabilità biologica ottenuta dopo il rimodellamento osseo. In particolare dipende dalla formazione di sostanza osteoide e al suo successivo rimodellamento intorno al dispositivo in titanio.

L'inserimento implantare implica un serie di insulti meccanici e una lesione ai tessuti molli e duri circostanti. Tanto minore è il trauma e il danno tissutale determinato al sito ricevente, tanto maggiore è la rapidità con cui l'osso si deposita sull'impianto, rinnovandosi.

Una volta inserito l'impianto, si innesca un processo biologico di guarigione caratterizzato da diverse fasi. Inizialmente, all'interno della cavità che è stata realizzata, si viene a costituire un coagulo di sangue.

In un secondo momento l'aumento della permeabilità dei vasi induce la migrazione di cellule mesenchimali e infiammatorie, seguito da un loro accumulo in situ.

Dal tessuto sottoposto al trauma e dal circolo ematico vengono rilasciati e attivati dei mediatori che andranno a stimolare la differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti.

Il coagulo sanguigno viene progressivamente riassorbito e sostituito con tessuto di granulazione.

In seguito gli osteoclasti intervengono rimuovendo il tessuto di granulazione con azione macrofagica, sostituendolo con una sostanza intercellulare provvisoria ricca di cellule mesenchimali, fibre e vasi sanguigni di nuova formazione.

Mediante il processo di osteogenesi a distanza e a contatto avverrà la deposizione di tessuto osseo immaturo a fibre intrecciate che, nel corso dei mesi successivi attraverso il rimodellamento osseo, verrà sostituito con midollo osseo e osso lamellare.

Al termine del processo di guarigione ossea, circa il 60-70% della superficie implantare rimarrà a contatto con l'osso.

La fase più delicata dell'osteointegrazione è individuata intorno alla seconda e quarta settimana dall'inserimento implantare e corrisponde al raggiungimento della stabilità secondaria. In questa fase prevale il processo di rimodellamento a livello della corticale per cui andrebbero evitati movimenti con oscillazioni superiori ai 100µm che potrebbero causare una fibrointegrazione con conseguente fallimento implantare. Tuttavia è possibile ricorrere al carico immediato nel caso in cui la stabilità primaria sia ottima e gli impianti siano solidarizzati con oscillazioni mantenute sotto i 50 µm.

### *1.7. Tessuti perimplantari*

I tessuti perimplantari che si formano intorno all'impianto vengono distinti in mucosa e osso perimplantare.

La mucosa perimplantare è il tessuto molle che si forma durante il processo di guarigione della ferita chirurgica intorno all'impianto, dal momento in cui viene inserito o dopo la connessione con l'abutment. Si viene a formare un attacco transmucoso, o sigillo biologico, intorno all'impianto che funge da barriera impedendo la diffusione di cataboliti e batteri dalla cavità orale e assicura l'osteointegrazione e la stabilità implantare. La mucosa perimplantare è formata da una porzione centrale di tessuto connettivo dove è possibile riscontrare una scarsa vascolarizzazione, frequenti infiltrazioni di cellule infiammatorie (macrofagi, neutrofili, linfociti) e allo stesso tempo un numero esiguo di fibroblasti (3%). Nel connettivo perimplantare le fibre connettivali impegnate nel periostio hanno un decorso parallelo all'asse lungo dell'impianto e sono maggiormente rappresentate rispetto al dente naturale. L'assenza del cemento e del legamento parodontale determina una scarsa percezione sensoriale e perdita di elasticità. Il tessuto connettivo è ricoperto da un epitelio orale cheratinizzato, il quale è a sua volta contiguo ad una sottile porzione di epitelio non cheratinizzato, definito epitelio giunzionale.

Il tessuto osseo perimplantare sostiene l'impianto inserito e garantisce la sua stabilità nel tempo. In particolare il 60-70% della superficie implantare è a contatto con osso mineralizzato, mentre la restante parte si rapporta con osso midollare, vasi e tessuto fibroso. Il tessuto osseo perimplantare inizia la sua formazione intorno alla seconda settimana dall'inserimento dell'impianto. Una volta che le cellule progenitrici si differenziano in osteoblasti, si osserva la deposizione di sostanza osteoide lungo il decorso dei vasi, la quale

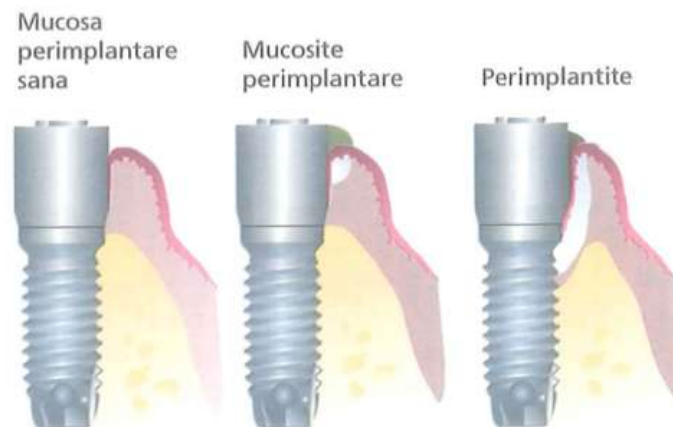
è principalmente costituita da una matrice di fibre collagene. Successivamente la matrice subirà un processo di mineralizzazione attraverso la precipitazione di cristalli di idrossiapatite. In concomitanza con lo sviluppo di tessuto osseo immaturo, definito anche a fibre intrecciate, si assiste al graduale riassorbimento delle pareti ossee alveolari. In seguito l'osso immaturo verrà sostituito con tessuto osseo lamellare e midollo osseo. Questo processo di rimodellamento richiederà diversi mesi prima del suo completamento.



## CAPITOLO II

### 1. MALATTIE PERIMPLANTARI

La malattia perimplantare è una condizione patologica associata a biofilm e contraddistinta da un processo infiammatorio dei tessuti che circondano l’impianto. Distinguiamo una lesione infiammatoria reversibile, definita mucosite perimplantare, e una lesione infiammatoria irreversibile, detta perimplantite.



*Figura 4 Rappresentazione schematica della mucosa perimplantare sana, della mucosite perimplantare e della perimplantite. (Lang N.P., Lindhe J., Clinical Periodontology and implant dentistry)*

*“La mucosite perimplantare è una lesione infiammatoria della mucosa perimplantare in assenza di una costante perdita ossea marginale” (JA Heitz-Mayfield L., 2018)*

È un’inflammazione della mucosa intorno all’impianto, indotta da placca, contraddistinta dalla presenza di sanguinamento al sondaggio e dall’assenza di riassorbimento osseo perimplantare. Possono essere obiettivati altri segni di infiammazione, quali gonfiore, rossore e suppurazione, e un possibile aumento della profondità di sondaggio rispetto agli esami clinici precedenti. Quest’ultimo segno può essere causato sia dall’edema sia dalla diminuzione della resistenza dei tessuti infiammati al momento del sondaggio. Qualora

venisse osservato un riassorbimento osseo radiografico, è opportuno ipotizzare che la malattia sia progredita nella sua forma irreversibile, ovvero la perimplantite.

Istologicamente, la lesione appare ben definita e delimitata lateralmente all'epitelio della tasca, senza estendersi in direzione apicale. Presenta un infiltrato infiammatorio ricco di plasmacellule, linfociti e strutture vascolari. La mucosite perimplantare ha un'eziologia batterica. Si sviluppa in seguito all'infiltrazione e successiva raccolta di batteri patogeni sugli impianti osteointegrati. Tuttavia, se il controllo della placca viene correttamente ripristinato, questo quadro patologico può andare incontro a risoluzione, anche se con tempi di guarigione superiori alle tre settimane.

*“La perimplantite è definita come una condizione patologica che si manifesta nei tessuti attorno agli impianti dentali, caratterizzata da infiammazione del tessuto connettivo perimplantare e progressiva perdita dell'osso di supporto” (Schwarz F., 2018).*

La perimplantite è una patologia associata a placca. Può esordire precocemente, manifestandosi in modo non lineare, e presentare un pattern di rapida progressione. I segni clinici elencati sono caratteristici di un quadro di perimplantite: rilevazione di sanguinamento nel sito implantare in seguito ad un sondaggio delicato (BoP) e riscontro di un'area di riassorbimento osseo ottenuta mediante una radiografia. Possono essere anche osservati edema e arrossamento dei tessuti molli, e frequentemente si individuano dei fenomeni suppurativi.

Dal punto di vista istologico, la lesione perimplantare è contraddistinta dalla presenza di macrofagi, plasmacellule e neutrofili. In particolare la presenza di polimorfonucleati è caratteristica non solo a livello dell'epitelio della tasca e delle aree di tessuto connettivo adiacenti, ma anche nei compartimenti perivascolari al centro dell'infiltrazione di cellule infiammatorie (Berglundh, 2004). La lesione perimplantare si estende apicalmente rispetto all'epitelio della tasca e la porzione apicale del tessuto molle della lesione raggiunge frequentemente il tessuto osseo. Inoltre, è stata riscontrata l'assenza di un rivestimento epiteliale tra la porzione apicale di tessuto connettivo infiammato e il biofilm sulla superficie implantare. Per quanto concerne la dimensione delle lesioni perimplantari è risultata maggiore se confrontata con le lesioni tipiche della mucosite perimplantare (Schwartz, 2018).

## 2. EZIOPATOGENESI DELLA PERIMPLANTITE

Il fattore eziologico primario della perimplantite è rappresentato dalla colonizzazione batterica dell'impianto, la quale determina non solo lo sviluppo ma anche il mantenimento e la progressione della malattia.

Il cavo orale è un ambiente caldo e umido in grado di ospitare numerose specie batteriche che si organizzano sulle superfici mucose e dentali, formando strutture denominate biofilm. Quest'ultimo viene definito come un'aggregazione di microrganismi aderenti gli uni con gli altri ad un substrato solido, inglobati in una matrice di polisaccaridi da essi prodotta. Quando il biofilm si è instaurato in un sito può rimanere in equilibrio con l'ospite nel tempo.

Al contrario, in seguito ad una perturbazione di vario genere (alterazione immunitaria, stress, dieta con consumo prevalente di carboidrati, accumulo di placca), la composizione del microbiota orale potrebbe modificarsi in maniera sfavorevole causando un disequilibrio batterico. Questa condizione, conosciuta come disbiosi, causa un aumento della proliferazione di batteri patogeni a discapito di quelli residenti, incrementando il rischio di insorgenza di patologie orali.

La composizione batterica presente nel biofilm è il risultato di relazioni specifiche che intercorrono tra le varie specie microbiche. In particolare, in uno studio condotto da Socransky et al (1998), sono stati descritti i complessi batterici orali osservati nei biofilm, associati a siti sani o affetti da parodontite:

- Complesso di *Actinomyces* spp.;
- Complesso costituito da *Streptococcus* spp. (complesso giallo);
- Complesso formato da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* (complesso verde);
- Complesso caratterizzato da *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula* (complesso viola);
- Complesso composto da *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus* (complesso arancione);

- Complesso rappresentato da *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* (complesso rosso).

I primi quattro complessi rappresentano i colonizzatori precoci, mentre gli ultimi si identificano con i colonizzatori tardivi.

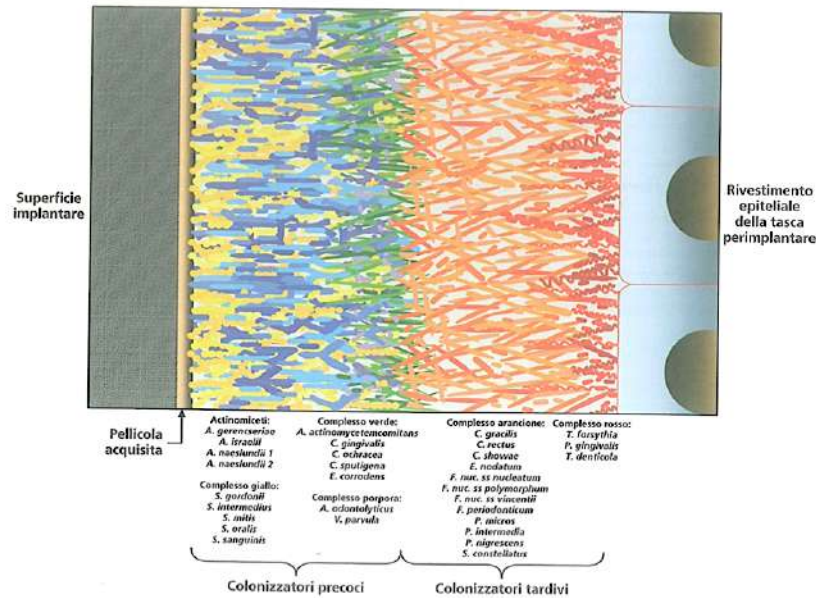


Figura 5 Rappresentazione schematica della successione microbica che può verificarsi su una superficie implantare quando entra in contatto con l'ambiente orale. I colori con cui le specie vengono identificate, sono stati scelti in base ai complessi descritti da Socransky et al. (1998) (Lang N.P., Lindhe J., *Clinical Periodontology and implant dentistry*)

La formazione del biofilm sopra e sotto gengivale è un evento fisiologico che si verifica subito dopo l'inserimento dell'impianto.

Non appena la componente transmucosa dell'impianto viene esposta all'ambiente orale, alcuni microrganismi cominciano ad aderire alla superficie, legandosi a loro volta a proteine e peptidi salivari. In questo modo si viene a costituire una pellicola acquisita di glicoproteine con dei recettori che interagiscono con le adesine presenti sulla superficie delle cellule microbiche.

Da questo momento comincia la formazione del biofilm sull'impianto. Nel giro di pochi minuti i primi colonizzatori implantari, quali *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp., prendono parte al processo di formazione del biofilm, interagendo con la pellicola acquisita.

Dapprima aderiscono alla superficie in modo blando, ma se riescono a resistere al distacco dalla pellicola possono iniziare a proliferare.

Durante il processo di crescita modificano l'ambiente microbico favorendo l'adesione di batteri secondari attraverso il meccanismo di co-aggregazione.

Nel corso di alcuni mesi, il biofilm diventa una struttura complessa e stabile, in grado di fornire una buona protezione verso gli agenti antimicrobici e le difese dell'ospite.

Il microbiota associato ai tessuti perimplantari sani è formato principalmente da cocchi Gram positivi (*Streptococcus* spp.), *Actinomyces* e *Veillonella* spp, mentre il conteggio di bastoncelli anaerobi Gram negativi e *Fusobacterium* spp. risulta complessivamente basso. In diversi studi, è stata dimostrata la possibile partecipazione di batteri parodontopatogeni quali *Tannarella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus intermedius*, all'interno di solchi perimplantari sani in pazienti parzialmente o totalmente edentuli (Koka et al, 1993). La presenza di questi microrganismi nei solchi prima dell'inserimento implantare va presa in considerazione, poiché è stato osservato che la conta batterica aumenta significativamente nei 4-6 mesi successivi all'intervento (Devides, 2006).

Come già discusso, fattori endogeni o esogeni possono alterare la composizione del biofilm, determinando la proliferazione di specie batteriche parodontopatogene intorno all' impianto. In particolare se attorno all'impianto o ai denti naturali adiacenti si formano delle tasche, quest'ultime possono dare ospitalità a specie batteriche più aggressive che riescono a proliferare. Il microbiota associato a malattie perimplantari è dominato da batteri gram negativi anaerobi, bastoncelli enterici, lieviti, microrganismi tipicamente associati a infezioni extraorali, come stafilococchi e pepto-streptococchi. *P. gingivalis* e *T. forsythia* risultano particolarmente espressi ed è stato osservato che, in corso di perimplantite, *P. gingivalis* sembra essere il patogeno con i più alti livelli riscontrati (Maximo et al, 2009).

Se focalizziamo l'attenzione sulle differenze esistenti tra la flora batterica riscontrata nei siti sopra e sotto gengivali a livello dello stesso impianto, possiamo concludere che non vi è una differenza significativa (Shibli et al, 2008). È stato però posto in evidenza come *P. gingivalis* e specie batteriche anaerobiche siano presenti in valori maggiori nelle tasche perimplantari profonde rispetto a quelle meno profonde.

Confrontando, in uno stesso paziente, i microrganismi prelevati in siti affetti da mucosite e in siti affetti da perimplantite, emerge che la flora batterica sia composta dalle medesime specie, corroborando l'ipotesi che la mucosite perimplantare possa essere il precursore della perimplantite (JA Heitz-Mayfield L., 2018). Solo in termini quantitativi sono state osservate

delle differenze: la conta di *T.forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* è maggiore in corso di perimplantite, mentre i livelli di *C.ochracea* sono aumentati nei siti coinvolti in un quadro di mucosite (Lindhe, 2020).

### 3. FATTORI DI RISCHIO DELLA PERIMPLANTITE

La cooperazione tra medico e paziente rappresenta la chiave del successo terapeutico, poiché è fondamentale per il mantenimento del risultato e per la diagnosi tempestiva di eventuali complicanze. La compliance può essere riassunta come un insieme di fattori psicologici e comportamentali che spingono il paziente a prendersi cura del proprio benessere. Senza una corretta comunicazione e una pianificazione di follow up periodici lo si espone più facilmente a fallimento implantare.

Dalla Letteratura corrente si evince infatti che i principali fattori di rischio per lo sviluppo della perimplantite siano lo scarso controllo della placca e una scarsa aderenza alla terapia di mantenimento successiva all'inserimento implantare (Berglundh, 2018). Inoltre gli esperti sono ormai concordi nel ritenere che una mancata terapia di supporto, dopo il trattamento della perimplantite, causi più frequentemente una recidiva della condizione patologica. Dovrebbero pertanto essere pianificate delle visite di controllo periodiche, non solo per monitorare il paziente nel tempo, ma anche per motivarlo a seguire le istruzioni per l'igiene orale domiciliare. Al momento della consegna del manufatto protesico è consigliabile registrare alcuni parametri che verranno esaminati anche durante i successivi follow-up:

1. Sondaggio dei tessuti perimplantari in più punti;
2. Radiografia del livello osseo perimplantare;
3. Registrazione del tragitto mucoso;
4. Valutazione della quota di mucosa cheratinizzata.

Di seguito vengono riportati i fattori di rischio per l'insorgenza della perimplantite che presentano maggior evidenza scientifica:

- Fattori paziente-dipendenti: scarsa collaborazione del paziente e scarsa igiene orale, parodontite pregressa, presenza di tasche parodontali nei siti adiacenti all'impianto, tabagismo, diabete e fattori genetici;
- Fattori operatore-dipendenti: assenza di mucosa cheratinizzata perimplantare, protesi incongrua, posizionamento implantare errato, mancata rimozione del cemento in eccesso;
- Caratteristiche dell'impianto.

Come già discusso, la mucosite perimplantare è il precursore della perimplantite, anche se non sono ancora chiare le modalità biologiche con cui avvenga questa conversione. È necessario dunque un intervento tempestivo per scongiurare l'insorgenza della perimplantite. Esistono numerose terapie per il trattamento della mucosite perimplantare in base alla condizione clinica del paziente. Solitamente l'approccio consiste in sedute di debridement ed educazione di igiene orale domiciliare, eventualmente affiancate dall'utilizzo di agenti antimicrobici. Tuttavia ancora non è stato universalmente riconosciuto un protocollo clinico come gold-standard.

Evidenze scientifiche hanno dimostrato come pazienti affetti da una storia di parodontite pregressa abbiano un maggior rischio di sviluppare perimplantite (Heitz-Mayfield, 2008) (Roccuzzo, 2010). Questa relazione trova spiegazione esaminando la flora batterica patogena, la quale è la medesima in entrambe le condizioni patologiche. I siti implantari di pazienti con una storia di parodontite sono infatti maggiormente suscettibili al biofilm patogeno. Inoltre è stato riscontrato che la perimplantite si sviluppa più di frequente in pazienti con tasche profonde rispetto a pazienti parodontali o sani senza tasche residue (Lee, 2012), poiché fungono da serbatoio per la colonizzazione batterica. Di conseguenza bisogna sempre escluderne la presenza prima di intraprendere un percorso implantare o andrebbero trattate prima di iniziarlo.

Dal momento che la parodontite ha alcuni aspetti comuni alla perimplantite, è stato naturale supporre che anche alcuni fattori di rischio, come l'abitudine al fumo e il diabete, potessero promuoverne l'insorgenza. Secondo i risultati ottenuti infatti, il tabagismo rappresenta un fattore di rischio statisticamente significativo per lo sviluppo della perimplantite, oltre che per la parodontite (Heitz-Mayfield, 2008) (Dreyer, 2018). In particolare, in pazienti con l'abitudine al fumo si riscontra un deterioramento della risposta immunitaria e una compromissione del processo di guarigione. Per quanto riguarda il diabete, sembra esserci una correlazione di rischio (Dreyer, 2018). In particolar modo, in pazienti con diabete scompensato è stato evidenziato un aumento degli indici di infiammazione perimplantare, quali sanguinamento al sondaggio e perdita ossea (Dioguardi, 2022). Il principale marker per valutare se un paziente diabetico ha un buon controllo glicemico è l'emoglobina A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>). Pazienti con un valore superiore all'8% hanno un maggior rischio di andare incontro ad un fallimento implantare (Schimmei, 2018). Questa osservazione sembra essere in accordo con altri studi, i quali concludono che un buon controllo glicemico e della placca determinano una riduzione della probabilità di contrarre la perimplantite (Shang, 2021).



Un altro aspetto rilevante che andrebbe considerato afferisce ai polimorfismi genetici per le citochine. Pur essendo delle modificazioni genetiche che non causano patologie, possono influire sulla risposta dell'ospite, in caso di un attacco batterico, o nei processi di guarigione. Nonostante questa consapevolezza, non viene raccomandato uno screening genetico preventivo prima di un trattamento implantare.

Nel caso in cui si palesasse un maggior rischio di sviluppare la perimplantite durante l'anamnesi, sarebbe opportuno informare il paziente prima di intraprendere un percorso implantare ed eventualmente programmare dei follow-up ogni 3-4 mesi.

Oltre ai fattori di rischio correlati al paziente, si annoverano anche degli indicatori di rischio operatore-dipendenti.

In primo luogo, un posizionamento implantare non ideale rappresenta un fattore di rischio per il successo terapeutico. Se gli impianti vengono posizionati troppo vicini ad altri o a denti naturali potrebbe determinarsi un'errata dispersione delle forze occlusali, con conseguente fallimento implantare.

In secondo luogo, la realizzazione di una protesi incongrua determina una notevole difficoltà nelle misure di detersione quotidiane e ostacola la capacità dello specialista di esaminare i tessuti perimplantari a fini diagnostici.

In terzo luogo, una ridotta ampiezza di tessuto cheratinizzato è maggiormente associata a perimplantite, accumulo di placca, infiammazione dei tessuti molli, recessioni e perdita di osso marginale (Ramanauskaite, 2022). L'ampiezza ideale che si consiglia di mantenere è  $\geq 2\text{mm}$ , poiché permette di formare un sigillo biologico intorno agli impianti, promuovendo la salute dei tessuti perimplantari.

Per concludere è stata osservata una maggior prevalenza della patologia implantare quando i restauri vengono cementati piuttosto che avvitati. La ragione è probabilmente connessa alla capacità dei batteri di aderire alla superficie ruvida del cemento in eccesso che, in relazione ad un'accessibilità limitata, aumenta il rischio di sviluppare la malattia. In particolar modo sono stati riscontrati più casi di perimplantite quando i margini della corona cementata erano sottomucosi (Staubli, 2016). Per ridurre l'impatto si consiglia di realizzare il margine della corona a livello mucoso.

Anche le caratteristiche della superficie implantare sembrano giocare un ruolo importante nell'avanzamento dell'infezione verso un quadro di perimplantite. È stato infatti rilevato che

la patologia progredisce in modo più rapido e accentuato sugli impianti ruvidi rispetto a quelli con superfici levigate. Tuttavia sono necessari più accertamenti per avere una conferma definitiva.

## 4. DIAGNOSI DI PERIMPLANTITE

La diagnosi di una malattia perimplantare non può prescindere dall'esecuzione di una corretta anamnesi che deve essere posta in essere nel momento in cui il paziente giunge alla nostra osservazione. Ovviamente se si tratta di un paziente che ha già iniziato un iter terapeutico presso la nostra struttura, avremmo già i dati necessari per poter passare all'esame obiettivo e sarà utile solo aggiornare l'anamnesi periodicamente.

### 4.1. *Diagnosi clinica*

In primo luogo si procede con l'ispezione dei tessuti molli perimplantari che possono presentare un aspetto edematoso, eritematoso e iperplastico con eventuale presenza di pus e/o recessione tissutale. La recessione, se presente, verrà valutata durante la rilevazione della profondità al sondaggio. Il paziente potrebbe lamentare anche dolore nella zona interessata. Tuttavia questi elementi non sono indicativi e sufficienti per confermare un caso di perimplantite. Infatti molti dei sintomi e segni elencati sono presenti anche in un quadro di mucosite che va posta in diagnosi differenziale.

Definiamo un caso di mucosite se sono presenti le seguenti caratteristiche:

- Presenza di sanguinamento e/o suppurazione al sondaggio, con o senza aumento della profondità al sondaggio rispetto ai controlli precedenti;
- Assenza di perdita ossea.

In alcuni casi di perimplantite, il paziente è totalmente asintomatico. Ad esempio, un paziente fumatore potrebbe essere affetto da perimplantite, senza manifestare i segni e i sintomi tipici a causa dell'effetto vasocostrittore della nicotina.

Dal momento che inizialmente la perimplantite interessa la porzione marginale dei tessuti perimplantari, la mobilità non è considerata un sintomo essenziale per la diagnosi. Infatti l'impianto può mantenersi stabile per un periodo variabile e solo nella fase finale andrà incontro a una completa perdita di integrazione con fallimento dell'impianto.

A questo punto si procede con il sondaggio peri-implantare (0,25N) compiuto con una sonda parodontale millimetrata in plastica che deve essere flessibile per evitare di danneggiare i tessuti. Viene delicatamente inserita nella tasca con un sondaggio eseguito in più punti, in base alla scelta dell'operatore. Lo scopo del sondaggio perimplantare è il rilevamento di sanguinamento e/o suppurazione nei siti valutati e di una profondità al sondaggio aumentata rispetto ai controlli passati. I valori clinici registrati vanno contestualmente segnati in cartella.

Definiamo un caso di perimplantite se sono presenti:

- Sanguinamento e/o suppurazione dopo un sondaggio delicato;
- Profondità di sondaggio aumentata rispetto ai precedenti valori;
- Perdita ossea rispetto alle precedenti valutazioni radiografiche, oltre alle variazioni del livello osseo crestale risultanti dal rimodellamento osseo iniziale.

In assenza dei dati ottenuti, la diagnosi si basa sui seguenti parametri:

- Sanguinamento e/o suppurazione dopo un sondaggio delicato;
- Profondità di sondaggio  $\geq 6\text{mm}$ ;
- Perdita ossea  $\geq 3\text{mm}$  rispetto al margine coronale della porzione intraossea dell'impianto.

Va inoltre attentamente considerata la diagnosi differenziale, non solo con la mucosite perimplantare, ma anche con casi di frattura dell'impianto, mancata osteointegrazione o mal posizionamento implantare che potrebbero dare segni simili a quelli riscontrati in caso di perimplantite.

Una volta terminato l'esame obiettivo si procede con la valutazione radiografica.

#### *4.2. Diagnosi radiografica*

La perdita ossea radiografica rappresenta un parametro importante per diagnosticare la perimplantite e per escludere un quadro di mucosite.

La perdita ossea è localizzata intorno all'impianto contaminato, dove appare una regione radiotrasparente. È generalmente simmetrica ovvero si verifica un interessamento analogo sui lati mesiali, distali, linguali e buccali portando alla formazione di difetti ossei.

Tuttavia un difetto osseo può avere una morfologia differente in base alla dimensione buccolinguale della cresta alveolare. Pertanto distinguiamo i difetti ossei angolari da quelli circolarizionali:

- Difetto osseo angolare: a seconda delle pareti residue può essere distinto in difetto a una parete, a due pareti o a tre pareti. Maggiore è il numero di pareti residue, maggiore è la possibilità di guarigione del difetto.
- Difetto osseo circolarizionale: è anche detto a quattro pareti, dove le pareti buccale e linguale vengono entrambe perse, oltre a quelle mesiale e distale.

Per la diagnosi potrebbe essere utile calcolare la perdita ossea annuale ad ogni follow-up, dal momento in cui è stato inserito l'impianto. Dopo il primo anno di carico infatti, una perdita ossea intorno agli impianti  $\geq 2\text{mm}$  deve far sospettare la presenza di uno stato di perimplantite, anche se la progressiva perdita ossea andrebbe indagata valutando la differenza con le misurazioni precedenti.

In alcuni casi sussiste una condizione di salute perimplantare con presenza di ridotto supporto osseo. Questa condizione può essere osservata in siti che in passato sono stati interessati da perimplantite e in seguito trattati con successo, oppure in siti in cui era presente una cresta ossea residua e si è comunque proceduto con un posizionamento implantare.

Gli esami radiografici che possono essere eseguiti per la diagnosi di perimplantite sono: l'ortopantomografia (OPT), l'RX endorale e la tomografia computerizzata (TC).

L'ortopantomografia permette di avere una visione completa delle arcate dentarie in cui sono stati inseriti gli impianti senza però fornire una valutazione dell'osso vestibolare e orale; in aggiunta non è possibile ottenere una visione nitida dell'immagine. Questo problema può essere superato utilizzando una RX endorale che consente una migliore valutazione per la diagnosi radiografica della perimplantite. Per poter valutare l'osso vestibolare e orale è invece necessario scegliere la tomografia computerizzata.

### *4.3. Esami di laboratorio*

Il prelievo di un campione da un sito implantare potrebbe essere un elemento di supporto per la diagnosi di perimplantite. Il campione microbiologico prelevato verrà analizzato in laboratorio per l'identificazione batterica.

## 5. TRATTAMENTO DELLA PERIMPLANTITE

I protocolli di trattamento per la perimplantite hanno lo scopo di arrestare la progressione della malattia riducendo la carica microbica, di ripristinare lo stato di salute della mucosa perimplantare e, se possibile, di rigenerare l'osso perimplantare perso.

La scelta della strategia terapeutica viene condotta basandosi sulla diagnosi e sulla gravità della lesione. Infatti le forme di perimplantite diagnosticate all'esordio richiedono un intervento meno invasivo e differente rispetto alle lesioni avanzate.

Dalla Letteratura si desume che il trattamento perimplantare dovrebbe essere seguito da una terapia di supporto, che è la *conditio sine qua non* del successo terapeutico, garantendo risultati clinici stabili e a lungo termine (Renvert et al, 2013) (Roccuzzo, 2018), a differenza di quanto avviene quando non è prescritta. Ciò è stato confermato in una revisione sistematica, in cui è stata osservata una recidiva di perimplantite nel 100% dei casi esaminati dopo un trattamento perimplantare non sostenuto da terapia di supporto con follow up superiore a 1 anno (Esposito et al, 2012).

Inizialmente si consiglia al paziente di sottoporsi a una o più sedute di igiene orale professionale che verranno affiancate a delle istruzioni personalizzate di igiene domiciliare. Questo primo approccio mira al controllo della placca per iniziare la terapia in condizioni favorevoli.

I trattamenti perimplantari vengono distinti in due macro-gruppi: trattamenti non chirurgici e chirurgici.

La terapia non chirurgica consiste in una detartrasi meccanica con o senza l'aggiunta di antisettici, priva di approccio visivo diretto. La visione indiretta rende la procedura non chirurgica poco predicibile ed efficace, in quanto si possono riscontrare delle difficoltà nell'esecuzione dovute all'accesso limitato e alla profondità eccessiva dei difetti ossei. Inoltre viene raccomandato di eseguire la detartrasi nella zona implantare in senso coronale o a livello del margine mucoso, onde evitare che i depositi di tartaro o placca migrino nella mucosa. Il trattamento non chirurgico ha spesso successo nelle forme iniziali, mentre risulta inefficace nei casi di perimplantite moderata e severa.

L'approccio chirurgico si ritiene necessario laddove la terapia non chirurgica non abbia risolto la perimplantite o non abbia arrestato la progressiva perdita ossea (Klinge, 2012) (Ramanauskaite, 2021). Le procedure non chirurgiche sono comunque indispensabili per ottenere un buon controllo dell'infezione. Una volta raggiunto, si realizza un lembo mucoperiosteo a tutto spessore che permette un accesso alla lesione "a cielo aperto", a cui segue la rimozione del tessuto di granulazione con conseguente esposizione della superficie implantare e del difetto osseo. A seguire si procede con la decontaminazione e un'eventuale ricostruzione o resezione dei difetti ossei residui.

In base alla condizione clinica del paziente si può perseguire una diversa scelta terapeutica:

- Chirurgia conservativa: consiste nella realizzazione di un lembo mucoperiosteo a tutto spessore con successiva decontaminazione implantare.
- Chirurgia resettiva: si tratta di una ostectomia del difetto osseo che ha lo scopo di ridurre la tasca, lasciando una parte della superficie implantare esposta per favorire le manovre di igiene. Viene indicata dunque nei settori posteriori per ragioni estetiche e nei casi in cui la perdita ossea si sia verificata orizzontalmente, escludendo così un approccio rigenerativo.
- Chirurgia rigenerativa: si consiglia questo tipo di intervento in caso di difetti ossei circolari attraverso l'uso di biomateriali, innesti o sostituti ossei associati con il posizionamento di una membrana per rigenerare l'osso perduto. Una successiva attenzione dovrà essere posta per la ri-osteointegrazione, ovvero la formazione di nuovo osseo e osteointegrazione di questo con la porzione di impianto interessata da perimplantite. Questo processo sembra essere strettamente influenzato dalle caratteristiche della superficie implantare.

La decontaminazione è un elemento fondamentale per la completa rimozione del complesso batterico perimplantare e rappresenta una delle sfide maggiori nel trattamento della perimplantite.

I metodi utilizzati per la decontaminazione implantare vengono distinti in:

- Trattamenti meccanici: curettes, strumenti a ultrasuoni, air polishing therapy, spazzole in titanio, implantoplastica.
- Trattamenti chimici: antibiotici, clorexidina, perossido di idrogeno, acido citrico, EDTA, soluzione fisiologica, EMD, acido ortofosforico.
- Trattamenti fisici: laser, terapia fotodinamica.



Le procedure di decontaminazione, che sono state appena elencate, possono essere utilizzate in combinazione tra loro o singolarmente. Confrontando i tre macro-gruppi non è possibile stabilire con certezza quale tipologia di trattamento risulti più efficace. Tuttavia la scelta di combinare diverse modalità di decontaminazione sembrerebbe dare buoni risultati (Francis, 2022).

### 5.1. *Trattamento meccanico*

Il trattamento meccanico della perimplantite consiste nella rimozione del biofilm dalla superficie implantare con degli strumenti che agiscono con un'azione meccanica.

L'applicazione del solo trattamento meccanico non è consigliato in quanto non fornisce esiti positivi per la guarigione, se non nelle lesioni iniziali. È stato infatti riscontrato che la rimozione meccanica non chirurgica dei detriti sugli impianti comporta una risoluzione transitoria, con un ritorno alle condizioni precedenti già dopo 6 mesi dalla fine della terapia (Persson et al 2010).

Il trattamento meccanico prevede l'utilizzo di varie tecniche, quali air polishing therapy, implantoplastica, spazzole in titanio, curettes e dispositivi ad ultrasuoni.

- *L'air polishing therapy* è una metodica decontaminante che prevede l'emissione ad alta pressione di granuli di diversa dimensione sulla superficie dell'impianto. Quest'ultimi possono essere in polvere di glicina, eritrolo, bicarbonato di sodio o fosfato tricalcico. Osservazioni condotte da vari studi dimostrano che il trattamento di air polishing con eritrolo addizionato a clorexidina rappresenta il gold standard di questa metodica per la rimozione del biofilm, in quanto è mini-invasivo, riduce la carica batterica e garantisce al paziente uno stato di comfort terapeutico. Le particelle di grandi dimensioni possono alterare la superficie implantare e compromettere la biocompatibilità (Francis, 2022). Sono stati valutati in particolare tre parametri: superficie, capacità decontaminante e biocompatibilità. È stato osservato che l'uso di polveri come la glicina, che possiede particelle di piccola dimensione, non determinavano danni superficiali, a differenza del bicarbonato di sodio o altre polveri con una maggiore durezza sulla scala Mohs. Allo stesso tempo però la glicina

mostrava una capacità decontaminante inferiore e non era in grado di ripristinare la biocompatibilità della superficie (Moharrami et al, 2019).

- L'*implantoplastica* può essere impiegata durante il trattamento chirurgico della perimplantite con lo scopo di rendere lucida la porzione implantare esposta al processo infiammatorio, mediante l'uso di frese abrasive montate su strumenti rotanti. Lo strato superficiale contaminato viene rimosso e il rischio di recidiva diminuisce, poiché la superficie viene resa meno ritentiva nei confronti della placca batterica. L'*implantoplastica* sembrerebbe fornire ottimi risultati nella risoluzione dell'infiammazione del tessuto perimplantare e una maggiore riduzione della profondità di sondaggio rispetto ad altri trattamenti meccanici. Questa ipotesi trova conferma anche in uno studio recente condotto nel 2022 (Li et al) che ha esaminato dieci protocolli applicati durante l'intervento chirurgico della perimplantite. Nonostante non sia stato possibile individuare un protocollo di elezione, il protocollo composto dall'esecuzione di un'*implantoplastica* con soluzione salina sembrava fornire dei miglioramenti significativi rispetto alle altre procedure. D'altro canto la scelta di questa metodica ha sollevato non poche preoccupazioni relative alle complicanze biologiche e meccaniche che può comportare: recessione gengivale, deposito di particelle di titanio, frattura dell'impianto e perdita della sovrastruttura.
- Le *spazzole in titanio (Ti-brush)* sono strumenti formati da una porzione in acciaio inossidabile alla cui estremità vi sono delle setole in titanio. Vengono montate su micromotore a basso numero di giri e riescono ad adattarsi alla struttura dell'impianto, raggiungendo anche i difetti più complessi senza determinare un'alterazione strutturale rilevabile. Dalla Letteratura emerge che le spazzole in titanio sono in grado di dare buoni risultati in termini di profondità di sondaggio, guadagno osseo radiografico e indice gengivale. In aggiunta sono in grado di decontaminare le superfici implantari in modo più decisivo rispetto all'uso di currettes (González, 2021) e di apportare dei miglioramenti all'osso marginale più significativi rispetto all'*air polishing* con glicina.
- Le *currettes* sono degli strumenti manuali affilati e resistenti che permettono la rimozione del tessuto di granulazione perimplantare e del biofilm dall'impianto. Vengono utilizzate principalmente nelle procedure non chirurgiche e possono essere in titanio, teflon, plastica o fibra di carbonio. Studi in vitro hanno indicato che, sebbene le currettes non metalliche non danneggino la superficie implantare, non hanno buone capacità decontaminanti, a differenza delle rispettive metalliche

(Baima, 2022). L'evidenza scientifica sottolinea che le curettes non rappresentano la scelta migliore tra i metodi meccanici proposti, ovvero sono meno performanti delle spazzole in titanio, dell'implantoplastica e dell'air polishing (Li et al, 2022). Difatti non sono in grado di raggiungere la totalità della superficie implantare, in particolare lo spazio compreso tra le spire.

- I *dispositivi ad ultrasuoni* sono strumenti in grado di rimuovere gli accumuli di tartaro dalla superficie implantare, mediante il montaggio di punte di vario materiale (teflon, acciaio inossidabile, PEEK) che vibrano quando azionate. Confrontando questa metodica con l'air polishing therapy risulta essere meno efficiente (Mensi, 2020) (Atieh, 2022).

Il problema principale di tutti questi dispositivi è che possono determinare un danno superficiale, rendendo l'impianto ruvido e di conseguenza soggetto all'accumulo di placca batterica.

## 5.2. *Trattamento chimico*

Il trattamento chimico dei casi di perimplantite è largamente diffuso. Infatti gli agenti chimici riescono a raggiungere delle zone inaccessibili meccanicamente, migliorando la performance decontaminante.

I principali agenti chimici, testati per il trattamento della perimplantite, sono: clorexidina digluconato, acido citrico, perossido di idrogeno, soluzione fisiologica, acido ortofosforico, EDTA ed EMD.

- La *clorexidina* è un antisettico, comunemente utilizzato in parodontologia e chirurgia orale per le sue proprietà battericide ad ampio spettro d'azione. In commercio viene venduta principalmente sotto forma di collutori e antimicrobici topici a diverse concentrazioni (0,12% oppure 0,2%). In realtà sembrerebbe essere più efficace alla concentrazione di 0,2% per la rimozione del biofilm (Ntrouka, 2010). Gli studi sono concordi nel ritenere che la clorexidina abbia un effetto antimicrobico poco significativo e limitato nel tempo, in particolare se paragonato con altri antisettici usati per il trattamento perimplantare (Renvert, 2008). Anche la combinazione di clorexidina allo 0,12% con cloruro di cetilpiridinio allo 0.05% non fornisce esiti

clinici e radiografici significativi con un follow up a 12 mesi (Khan, 2020). Inoltre alcuni studi segnalano che la clorexidina sia citotossica e possa compromettere negativamente non solo la biocompatibilità, ma anche la risposta osteoblastica (Kotsakis, 2016) (Giannelli, 2008) (Schwarz, 2005).

- L'*acido citrico* è una sostanza chimica che può essere usata nel trattamento della perimplantite. In molti studi in vitro è stata osservata la sua capacità nel rimuovere i biofilm dalle superfici implantari contaminate, seppure non totalmente (Kotsakis, 2016). Tuttavia la Letteratura non è concorde nell'indicare la concentrazione e le tempistiche ideali per la sua applicazione, ma essendo l'acido citrico una sostanza acida che potrebbe danneggiare i tessuti perimplantari, si consigliano basse concentrazioni.
- Il *perossido di idrogeno* è un efficace antisettico che può essere scelto con una concentrazione del 3% o 10% nel trattamento della perimplantite. È combinabile con l'uso di antibiotici sistemici o sostituti ossei con o senza membrane riassorbibili. Questa sostanza garantisce la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule epiteliali dopo il trattamento. (Ungvári, 2010). Si consiglia di utilizzare il perossido di idrogeno a basse concentrazioni, in quanto non è privo di rischi derivanti dal contatto con i tessuti perimplantari.
- La *soluzione fisiologica* viene applicata come agente irrigante o con azione di strofinamento mediante garze chirurgiche imbevute. Può presentarsi a varie concentrazioni e viene usata spesso con altri antisettici.
- L'*acido ortofosforico* è un agente chimico preferenzialmente impiegato al 35-37% per la terapia implantare. Se messo a confronto con altri antisettici non ha mostrato esiti clinici e microbiologici superiori. Dalla Letteratura emerge la raccomandazione di prestare attenzione all'utilizzo di questo acido, perché potrebbe causare un danno ai tessuti circostanti e sfavorire il processo di ri-osteointegrazione.
- L'*EDTA* è una soluzione adoperata ampiamente in endodonzia, ma anche destinata al trattamento della perimplantite in quanto presenta un significativo effetto antimicrobico. È solitamente utilizzata ad una concentrazione pari al 24% e può anche essere abbinata con l'ipoclorito di sodio all'1,5% (Kotsakis, 2016). È stato recentemente proposto il suo impiego all'interno del protocollo CMM chirurgico che consta in 6 fasi (Ramanauskaite, 2016).

<b>Fasi di trattamento</b> <b>(I-II conservative; III-VI chirurgiche)</b>	<b>Descrizione delle procedure</b>
Step I: debridment sottogengivale e trattamento antimicrobico locale	Debridment sottogengivale e trattamento antimicrobico locale
Step II: istruzione delle corrette misure di igiene orale	Controllo dopo 4 settimane
Step III: debridment a lembo aperto	Debridment a limbo aperto con curette in titanio o fibra di carbonio sulla superficie dell'impianto
Step IV: decontaminazione	Decontaminazione tripla: a) lucidatura ad aria con polvere di glicina per 60s b) applicazione di EDTA al 24% per 2min c) irrigazione continua per 60s con clorexidina gluconato (0,12%)
Step V: rigenerazione del difetto osseo	Preparazione del coagulo e delle membrane di fibrina ricco di leucociti e piastrine (L-PRF): 2,800rpm, 12min di centrifuga. Rigenerazione del difetto osseo con composito L-PRF, alloinnesto osseo liofilizzato demineralizzato (DFDBA) e gantamicina (gentamicina solfato 2mg/mL)
Step VI: terapia di supporto	Follow up e controllo dell'igiene orale ogni 3 mesi durante il primo anno e successivamente ogni 6 mesi

- È stato indagato l'uso di un derivato della matrice dello smalto (*EMD*), visti i buoni risultati apportati nella terapia chirurgica parodontale (Sculean, 2008). Dagli studi in vitro e in vivo emerge che l'uso aggiuntivo di *EMD*, nella terapia chirurgica della perimplantite con follow up a 5anni, eserciti un effetto repressivo sui batteri Gram-

anaerobi e rigenerativo sull'osso perduto (Isehed, 2016) (Isehed, 2018) (Khan, 2020). È stato inoltre riscontrato che nel trattamento chirurgico, in combinazione con l'acido etilendiamminotetracetico, determina una significativa riduzione della profondità al sondaggio e comporta un guadagno osseo radiografico dopo 3 anni (Faramarzi, 2015). L'EMD può essere combinata a un trattamento meccanico, anche se attualmente sono stati osservati solo gli esiti a breve termine di questa metodica.

Anche gli *antibiotici* possono essere adoperati nel trattamento della perimplantite, in particolare le tetracicline, la minociclina e la doxiciclina, il metronidazolo e l'eritromicina.

- La minociclina e la doxiciclina sono dei derivati delle tetracicline con ottime capacità antimicrobiche ad azione prolungata. Tuttavia l'impiego della minociclina deve essere ponderato, poiché può causare fenomeni di resistenza antibiotica se applicata ripetutamente.
- Anche l'applicazione di metronidazolo va prescritta con attenzione, valutando scrupolosamente la quantità e la concentrazione somministrata. Il metronidazolo presenta proprietà antimicrobiche verso una vasta gamma di batteri, così come l'eritromicina che è un macrolide caratterizzato anche da effetti antinfiammatori.

L'uso di antibiotici topici o sistemici nella gestione della perimplantite ha trovato dei punti di vista contrastanti in Letteratura. Da un lato si delinea la teoria secondo la quale gli antibiotici rappresentano un buon supporto per il trattamento della perimplantite, diminuendo sia la profondità che il sanguinamento al sondaggio (Baima, 2022) (Renvert, 2008) (Esposito, 2012). Possono essere combinati con l'uso di sostanze antisettiche favorendo la risoluzione di casi di perimplantite grave, come emerge anche da uno studio condotto con un follow up a 5 anni (Leonhardt, 2003). In alternativa possono essere considerati una terapia aggiuntiva al trattamento meccanico, determinando risultati altrettanto favorevoli, senza causare effetti avversi (Toledano, 2021). Gli antibiotici possono essere anche combinati tra loro, per esempio metronidazolo con amoxicillina, con esito favorevole sulla riduzione della conta batterica di patogeni associati a perimplantite (Wang, 2022). Non è però chiaro quale antibiotico fornisca i risultati migliori. Al contrario altri esperti pongono all'attenzione il rischio di promuovere lo sviluppo della resistenza batterica agli antibiotici, che è una questione che si sta imponendo in maniera sempre più rilevante all'interno della comunità scientifica. Secondo questa linea di pensiero bisognerebbe adottare un atteggiamento restrittivo verso l'uso degli antibiotici nei casi di perimplantite

per scongiurare il fenomeno della resistenza microbica. Quindi, come per il trattamento della parodontite (Mombelli et al, 2012), si potrebbero raccomandare i seguenti accorgimenti:

1. Limitare l'utilizzo di antibiotici a pazienti ad alto rischio e laddove l'approccio meccanico non sia stato sufficiente per il raggiungimento del successo terapeutico;
2. Preferire le terapie combinate, quali amoxicillina e metronidazolo;
3. Somministrare dosi elevate per un breve periodo;
4. Utilizzare gli antibiotici in aggiunta ad altri trattamenti.

In alternativa alcuni esperti propongono di scegliere una gestione chirurgica della perimplantite, evitando così la somministrazione di antibiotici, rispetto all'opzione non chirurgica dove la terapia antibiotica sembra avere un impatto di rilievo nella riuscita del trattamento (Khan, 2020).

Passiamo ora in rassegna alcuni *protocolli antinfettivi* trovati in Letteratura.

Il primo protocollo chirurgico esaminato è rivolto ai casi di perimplantite moderata o severa (Heitz-Mayfield, 2011). È risultato efficace fino a 12 mesi dopo la terapia e prevede i seguenti passaggi:

1. Realizzazione di un lembo di accesso mucoperiosteo.
2. Decontaminazione della superficie dell'impianto con curettes, irrigazione con soluzione salina sterile e strofinamento con garze imbevute con soluzione fisiologica.
3. Somministrazione post intervento di amoxicillina in combinazione con metronidazolo.
4. Prescrizione di sciacqui con clorexidina 0,2%, istruzione di igiene orale domiciliare e richiami di igiene professionale.

Un altro protocollo, conosciuto come MAINST (Mensi, 2017), è stato studiato per il trattamento non chirurgico della perimplantite. Consiste nella combinazione di un antibiotico topico con l'air polishing therapy e curettage, scandito nelle seguenti fasi:

1. Iniziale somministrazione di doxiciclina iclata 14%.
2. Air polishing therapy con polvere di eritrolo veicolata da un puntale sottogengivale dopo 7-12 giorni.
3. Debridment con dispositivo piezoceramico con punta in PEEK.
4. Curettage della tasca.
5. Applicazione di un antibiotico topico.

6. Controlli periodici, richiami di igiene professionale trimestrale e istruzione all'utilizzo dei presidi domiciliari.

### 5.3. *Trattamento fisico*

Il trattamento fisico della perimplantite può essere condotto attraverso l'utilizzo di laser o di una terapia fotodinamica.

- La *laserterapia* è stata proposta come trattamento per la decontaminazione della superficie implantare; possiamo distinguere vari tipi di laser: Er:YAG, diodi, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG. Il laser a diodi (980nm) è in grado di abbassare la conta batterica, specialmente se combinato alla terapia meccanica, senza modificare la superficie dell'impianto. Il laser Er:YAG, con una potenza a bassa intensità, agisce contro i batteri parodontopatici e riduce i segni clinici della perimplantite. In Letteratura vi sono pareri discordanti sull'effettivo vantaggio clinico dei laser. Secondo alcuni studiosi, a distanza di 6 mesi, il laser garantisce buoni risultati sia in termini di guadagno osseo radiografico sia di controllo dell'infiammazione (Ting, 2022). Al contrario, altri esperti sostengono che riduca i segni dell'infiammazione solo per un breve periodo (Joshi, 2022), senza apportare dei benefici clinicamente significativi rispetto al solo impiego della terapia meccanica (Francis, 2022). È probabile che i limitati miglioramenti clinici siano dovuti alla complessa rimozione del biofilm dalle tasche profonde e alle caratteristiche macrostrutturali dell'impianto. Inoltre anche i vari parametri dei laser, come la lunghezza d'onda, il diametro della fibra ottica e la durata dell'impulso, possono influire sulla capacità battericida dello strumento (Kotsakis, 2014). Per concludere si consiglia di utilizzare il laser come supporto iniziale alla terapia chirurgica della perimplantite, o eventualmente con sedute ripetute.
- La *terapia fotodinamica* consiste nell'impiego di un laser a diodi (con lunghezza d'onda di 905nm), il quale attiva un colorante fotosensibile (blu di metilene, blu di toluidina), determinando il rilascio di radicali liberi dell'ossigeno. Quest'ultimi sono in grado di interagire con i microrganismi, diminuendo la conta batterica senza causare danni ai tessuti circostanti. È stato però evidenziato che gli effetti del trattamento dipendono dal tipo di fotosensibilizzante utilizzato. La terapia



fotodinamica non ha avuto dei risultati significativamente maggiori rispetto a quelli ottenuti tramite i trattamenti decontaminanti meccanici e chimici (Li et al, 2022) (Zhao,2021). Tuttavia se utilizzata in combinazione con il trattamento meccanico, permette una riduzione della profondità di sondaggio maggiore rispetto ai valori raggiunti con il solo debridement.

A conclusione di questa ricerca, in cui sono stati analizzati e descritti dettagliatamente numerosi metodi per il trattamento della perimplantite, è stato appurato che in Letteratura non sia ancora presente un protocollo per la risoluzione definitiva di questa patologia.

## SEZIONE SPERIMENTALE

Nel capitolo precedente sono state analizzate in Letteratura le terapie attualmente proposte per il trattamento della perimplantite. Nonostante la seguente malattia rappresenti una delle complicanze più frequenti in implantologia, nessuna di queste metodiche si è dimostrata realmente efficace.

Sulla base di queste considerazioni, è stata condotta una ricerca scrupolosa che mirava a individuare nuovi agenti chimici le cui potenzialità potessero essere sfruttate per trattare la perimplantite. In particolare l'obiettivo di questa tesi è di testare in vitro la capacità decontaminante di nuove sostanze biocompatibili con l'organismo su impianti contaminati con patogeni responsabili della perimplantite. Sono stati individuati due agenti chimici promettenti: EC-STER e argento colloidale.

Nella prima parte dell'analisi sperimentale si è reso necessario assicurarsi che l'applicazione delle sostanze sull'impianto non causasse un'alterazione strutturale della superficie. Pertanto è stata inizialmente valutata la tessitura superficiale dell'impianto controllo, affinché potesse essere comparata con quella degli impianti su cui erano stati applicati EC-STER e argento colloidale. I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con quelli di altri decontaminanti comunemente utilizzati nella terapia implantare, ovvero acido ortofosforico e clorexidina.

Una volta esclusa l'alterazione strutturale indotta dai seguenti agenti chimici, è stata testata in vitro la capacità decontaminante di EC-STER e argento colloidale su impianti contaminati con biofilm pre-formati di batteri prelevati da siti affetti da mucosite perimplantare. In particolare, è stata valutata la distribuzione batterica ottenuta dopo l'applicazione delle sostanze antimicrobiche. La tecnica MALDI-TOF ha permesso di identificare le colonie batteriche che si sono sviluppate dopo il trattamento e di elaborare delle conclusioni finali.

## CAPITOLO III

### 1. EC-STER



*Figura 6 EC-STER utilizzato per la sperimentazione*

EC-STER è una sostanza sterilizzante a freddo, a base enzimatica, solubile in acqua e inodore. Classificata come un dispositivo medico CE 0546 di classe IIb, è composta da ossidanti tamponati e attivatori. Può essere commercializzata sottoforma di spray o polvere bianca; quest'ultima deve essere miscelata con acqua a temperatura ambiente per 10 minuti, in modo da essere attivata prima del suo utilizzo. La soluzione attiva deve avere un valore di pH 8,5-9,5 a una temperatura di 20°C.

È stato dimostrato che EC-STER non produce vapori o esalazioni tossiche durante il suo impiego e non causa reazioni di sensibilizzazione da contatto sulla cute asciutta. Essendo un prodotto ad ampio spettro d'azione, è perfettamente in grado di eliminare i batteri gram-positivi e gram-negativi, il *Mycobacterium tuberculosis*, i virus (compresi HIV, HBV e HCV), i funghi e le spore.

È stato dimostrato che i radicali liberi rivestono un'importanza considerevole nel meccanismo di azione di EC-STER. Si definisce radicale libero una specie chimica, atomo o molecola, di natura organica o inorganica, altamente instabile che presenta uno o più elettroni spaiati nei suoi orbitali. Questa caratteristica rende il radicale altamente reattivo in grado di acquistare o cedere elettroni con altre specie al fine di accoppiare l'elettrone spaiato. In ambito medico, la teoria dei radicali liberi di natura organica venne discussa per la prima

volta nel 1956 da Denham Harman, il quale sostenne che l'azione continua di queste specie nell'uomo determinasse dei fenomeni legati all'invecchiamento cellulare. In particolare l'attività dei radicali liberi si esplica a livello di DNA, proteine e lipidi causando degradazione delle pareti cellulari e calo delle attività enzimatiche. Tuttavia esistono dei meccanismi nell'organismo umano che regolano la produzione di questi radicali, utilizzandoli per assolvere delle funzioni vitali importanti.

Nello specifico EC-STER fonda il suo principio attivo sull'azione di radicali liberi inorganici ad attività riducente, determinando uno scambio di elettroni con i microrganismi. Questo evento provoca un danno irreversibile alla loro struttura proteica, denaturandola ed è inoltre in grado di dissolvere i residui organici.

I radicali liberi si generano quando è avvenuto il contatto di EC-STER con un veicolo acquoso basico, garantendo in pochi secondi la sterilizzazione delle superfici e dei dispositivi trattati senza causarne l'ossidazione o la compromissione strutturale. In particolare questo agente antimicrobico può essere impiegato sulla superficie di tavoli operatori, riuniti, ripiani porta strumenti, apparecchiature sanitarie, e infine dispositivi medici invasivi e non invasivi.

## 1. ARGENTO COLLOIDALE



*Figura 7 Argento colloidale utilizzato per la sperimentazione*

L'argento colloidale è una soluzione composta da ioni e particelle di argento sospese in acqua depurata.

Il suo primo impiego risale all'antichità poiché, fin da allora, erano state comprese le proprietà antivirali, antimicotiche e antibatteriche di cui è caratterizzato. Rappresenta una valida alternativa agli antibiotici, giocando un ruolo importante nel fronteggiare il problema della resistenza batterica. Le caratteristiche dell'argento colloidale hanno portato ad utilizzarlo su rivestimenti di dispositivi medici, e infine come agente antinfiammatorio e cosmetico.

In odontoiatria l'argento colloidale trova applicazione per:

- il trattamento di gengiviti e parodontiti;
- la medicazione di ferite in seguito a estrazioni dentali, chirurgia implantare o altri interventi chirurgici nel cavo orale;
- la terapia di afte, mucositi, ulcere e Burning Mouth Syndrome.

Inoltre può essere utilizzato in conservativa, in endodonzia e in protesi per evitare l'insorgenza di infezioni micotiche e infiammazioni.

Viene commercializzato solo come agente topico sottoforma di spray, gocce, creme, collutori o cerotti. La legge italiana non ne consente infatti la somministrazione sistemica. In particolare la Direttiva Europea 93/42/CEE IX Regola 5 descrive l'argento colloidale come un dispositivo medico di classe 1, ovvero come un dispositivo invasivo che penetra parzialmente o interamente l'organismo tramite un orifizio o la superficie del corpo. Per questo motivo può essere utilizzato nel settore odontoiatrico, purché sia somministrato come topico ad impiego temporaneo.

L'argento è un metallo di transizione che viene indicato con il numero 47 nella tavola periodica. In forma elementare non è reattivo contro i microrganismi, pertanto deve subire un processo di ionizzazione. Il metodo gold standard per acquisire l'argento colloidale è l'elettrolisi. Ci si serve di due elettrodi d'argento puro al 99,99% posizionati di solito in acqua bi-distillata, e successivamente sottoposti ad una tensione elettrica. Da questi elettrodi si ottiene la scissione di particelle d'argento non solubili in acqua e di ioni d'argento solubili.

Le nanoparticelle d'argento (AgNPs) contengono dai 20 ai 15000 atomi di argento con un diametro inferiore a 100nm. In alcune forme recenti d'argento colloidale, le nanoparticelle vengono stabilizzate. La stabilizzazione viene promossa usando degli agenti quali il citrato di sodio, il polivinilpirrolidone (PVP) o il polietilenglicole (PEG) che sembrano aumentare l'efficacia delle proprietà dell'argento e diminuire il rischio di tossicità nell'organismo.

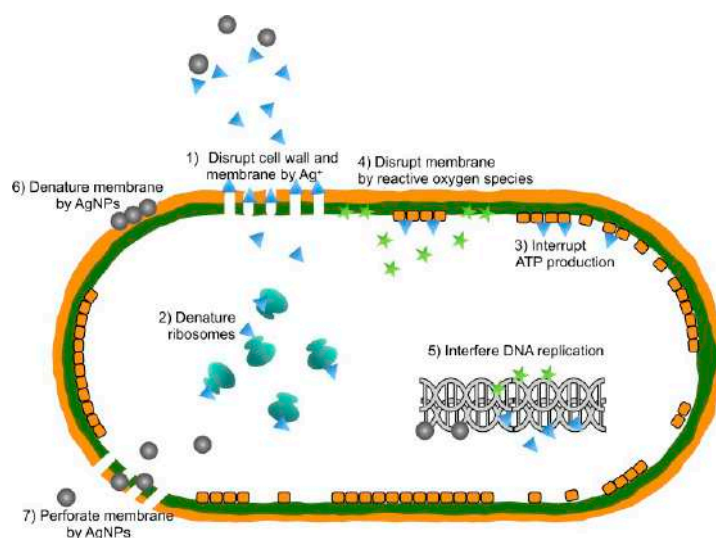


Figura 8 Schema riassuntivo che mostra l'azione dell'argento nei confronti del batterio. (Yin et al, 2020)

L'argento colloidale agisce contro i microrganismi allo stato planctonico, gram-negativi e gram-positivi, ed è parzialmente efficace contro i biofilm. È stato osservato che, a causa

dell'ampio rapporto superficie-volume, le nanoparticelle di argento sono in grado di eliminare i patogeni anche quando il prodotto possiede una bassa concentrazione. Una volta che quest'ultimo è stato somministrato, viene assorbito lentamente nei tessuti e si diffonde nel sangue, esercitando un'azione terapeutica prolungata nel tempo. Raggiunte le cellule, le particelle d'argento aderiscono alla parete batterica. Da un lato l'argento agisce disaggregando la parete cellulare e dall'altro invade lo spazio intracellulare dove può interagire con vari enzimi, fondamentali per le funzioni metaboliche del microrganismo, rendendoli disfunzionali. Questa alterazione enzimatica, associata ai danni al DNA e all'alterazione dei processi respiratori batterici (Reidy, 2013) (Li, 2008), innesca un aumento esponenziale di specie reattive dell'ossigeno che causano stress ossidativo e conseguente compromissione dei processi trascrizionali e delle proprietà fisiche della cellula stessa, determinando infine la morte cellulare (Durán, 2010) (Durán, 2016).

In particolare l'argento colloidale è efficace contro determinate specie batteriche, quali *Streptococcus pyogenes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus oralis*, *Pseudomonas auriginosa*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Pérez-Tanoira, 2022). Alcuni studi hanno dimostrato che, quando i microrganismi sono organizzati in biofilm, le nanoparticelle intervengono riducendo l'adesione batterica, ma non sono altrettanto efficaci nel disaggregare il biofilm, soprattutto se si tratta di nanoparticelle di grandi dimensioni.

Alcuni parametri fisico-chimici possono influenzare gli effetti antimicrobici dell'argento.

In primis la dimensione delle particelle di argento. È stato osservato che AgNPs di piccole dimensioni hanno una migliore attività antibatterica, probabilmente dovuta al fatto che possiedono un miglior rapporto superficie-volume. Inoltre riescono a penetrare con maggior facilità attraverso la parete cellulare dei microrganismi. Quando le particelle d'argento possiedono dimensioni inferiori a 10nm, l'attività antimicrobica è realizzata prettamente dalle nanoparticelle, mentre quando le dimensioni sono maggiori il meccanismo è principalmente compiuto dagli ioni d'argento rilasciati.

Il secondo parametro che influenza l'attività antibatterica è la forma delle AgNPs.

Infine, il terzo parametro è costituito dalla concentrazione delle nanoparticelle d'argento che gioca un ruolo importante. La concentrazione ottimale dell'argento colloidale è solitamente tra i 10-20ppm fino ad un massimo di 100ppm, in base al formato commercializzato. Se la concentrazione supera i 20ppm però, aumentano le dimensioni delle particelle che

tenderanno ad aggregarsi tra loro. Alcuni studi hanno dimostrato che, per debellare i batteri gram-positivi, è necessaria una concentrazione più elevata rispetto a quella utilizzata per il trattamento dei gram-negativi. Questa affermazione trova spiegazione nella struttura della parete batterica dei gram-positivi che è più spessa e rigida; inoltre il peptidoglicano è più rappresentato, rendendo complesso il passaggio delle nanoparticelle d'argento attraverso la parete batterica.

Nonostante l'argento mostri ottime capacità antimicrobiche, gli esperti hanno sollevato alcune preoccupazioni relative alla sua tossicità. Tuttavia è stato osservato che l'impiego di argento colloidale espone il paziente ad un rischio praticamente assente rispetto all'argento ionico. La tossicità infatti dipende dalla liberazione di ioni d'argento che potrebbero innescare una risposta pro-infiammatoria dovuta alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno. Di conseguenza è consigliabile adottare tempi di reazione lunghi, durante la produzione, così da portare a termine la fase di nucleazione per ottenere una concentrazione maggiore di nanoparticelle e inferiore di ioni d'argento (Hatipoglu, 2015).

È stato osservato che gli effetti potenzialmente nocivi dell'argento colloidale sarebbero anche correlati alle dimensioni delle nanoparticelle di argento. Da quanto emerso in Letteratura, però, nanoparticelle di piccole dimensioni e ad alte concentrazioni non hanno determinato una tossicità significativa sull'organismo.

Secondo il National Institute for Occupational Safety and Health (2005) la dose tossica di particelle di AgNPs corrisponde a un valore pari o superiore a  $10\mu\text{g mL}$ . Nei casi di esposizione cronica all'argento può verificarsi argiria, ovvero una patologia dove la pelle assume una colorazione grigio-bluastro; inoltre potrebbero insorgere deficit neuronali, epatici o renali.

Tuttavia, come già sottolineato, l'uso dell'argento colloidale è consentito solo come applicazione topica ad uso temporaneo e pertanto viene praticamente azzerato il rischio di sviluppare un quadro di argiria.

Viene infine raccomandato di non assumere argento colloidale in gravidanza, poiché verrebbe trasmesso al feto per via transplacentare.



## 2. ANALISI DI SUPERFICIE

### 2.1. *Materiali e metodi*

La realizzazione di questa tesi ha previsto l'impiego di impianti TS III in Titanio di grado IV dell'azienda Osstem, precedentemente sottoposti a sabbiatura e successiva mordenzatura acida (SLA) per ottenere la macro e la micro-rugosità di superficie. In particolare sono stati utilizzati nove impianti, di cui un controllo negativo.

Gli impianti sono stati esposti a quattro diversi agenti chimici:

- Argento colloidale in gel
- EC-STER in polvere
- Acido ortofosforico 37% in gel
- Clorexidina 0,2% liquida

Ciascuna sostanza è stata applicata su due impianti: sul primo impianto è stata mantenuta in situ per 5 minuti, mentre sul secondo è stata lasciata per un intervallo di tempo maggiore, pari a 15 minuti.

Successivamente gli impianti sono stati immersi in soluzione fisiologica, per rimuovere le sostanze dalla superficie, e poi collocati in provette sterili.

L'analisi dei campioni è stata condotta presso il Dipartimento di Fisica dell'Università degli studi di Perugia. È stato utilizzato un microscopio elettronico a scansione ad ingrandimenti di 100X e 1000X che ha permesso di condurre un'analisi topografica superficiale degli impianti.

Inizialmente i campioni sono stati estratti dalla provette e fissati ciascuno su un portacampione. Le misure sono state ottenute analizzando, su ciascun impianto, un'area di superficie selezionata in modo casuale tra le spire della parte centrale del corpo dell'impianto.

In un secondo momento è stata eseguita la microanalisi chimica dei campioni, sfruttando la spettroscopia a dispersione di energia.

## 2.2. *Microscopia a Scansione Elettronica (SEM)*

Un microscopio elettronico a scansione (SEM) è uno strumento che permette di acquisire delle immagini con ingrandimenti compresi tra 100 e 1nm, ma consente anche di visualizzare la composizione del materiale e infine di effettuare degli esperimenti dinamici sul campione all'interno del microscopio stesso.

Per ottenere un'immagine della superficie esaminata viene sfruttato un fascio di elettroni, generato da un emettitore che viene precedentemente riscaldato. Gli elettroni vengono accelerati, passando attraverso una differenza di potenziale che imprime ad essi una certa energia, sufficiente a raggiungere il campione attraverso la colonna.

All'interno della colonna del microscopio sono collocate delle lenti che hanno la funzione di modulare il fascio e delle aperture che possiedono la capacità di selezionare gli elettroni vicini all'asse del microscopio.

Gli elettroni in ultimo colpiscono il campione e dall'interazione tra atomi ed elettroni si generano dei segnali che vengono catturati tramite detector per ottenere l'immagine. I detectors possono essere multipli e avere applicazioni differenti; infatti, sono presenti numerose porte di ingresso per il montaggio di nuovi detectors in base alle necessità.

All'estremità opposta rispetto all'emettitore, vi è una camera dove viene alloggiato il campione, su un apposito porta-campione. All'interno della camera è presente un sistema di vuoto per evitare che il fascio di elettroni incontri ostacoli durante il flusso; pertanto vi sono delle pompe che hanno la funzione di eliminare l'aria all'interno. Qualora fosse necessario aprire la camera per posizionare i campioni, si dovrà riportare gradualmente la pressione atmosferica all'interno della camera.

Per poter essere analizzati, i campioni devono essere allo stato solido. Solitamente il porta-campione su cui viene posizionato il materiale è un dischetto in alluminio dal diametro di 1cm. Tuttavia, è possibile posizionare anche campioni di dimensioni maggiori, pur rispettando le dimensioni della camera.

I porta-campioni vengono a loro volta montati su un carosello che può ospitarne un numero limitato per volta.

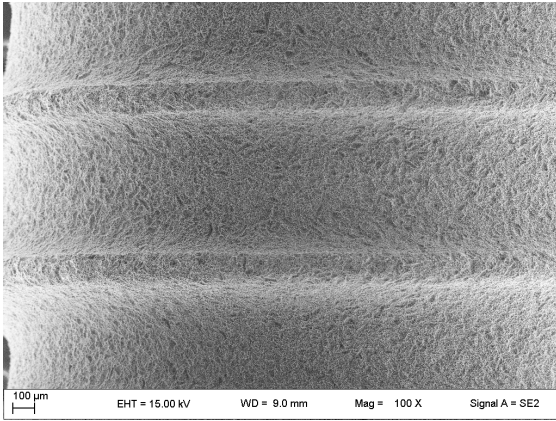
Il microscopio a scansione elettronica può essere provvisto di un rivelatore in grado di distinguere l'energia dei raggi X emessi dal campione (spettroscopia a dispersione di energia, o EDS) e con il quale è possibile determinare la composizione chimica del materiale. La microanalisi chimica di un campione è basata sul principio secondo il quale ogni elemento possiede una propria struttura atomica che avrà uno specifico spettro di emissione. Quando il fascio di elettroni accelerato viene indirizzato sul campione interagisce con i suoi atomi, determinando un'eccitazione. Per riottenere la stabilità elettronica dell'atomo viene prodotta energia rilasciata sotto forma di raggi X che verranno convogliati da un rivelatore e convertiti in tensione elettrica. Ciò che si ottiene è uno spettro di emissione dove le tensioni vengono osservate graficamente come dei picchi che permettono di caratterizzare il campione da un punto di vista chimico.

### *2.3. Risultati*

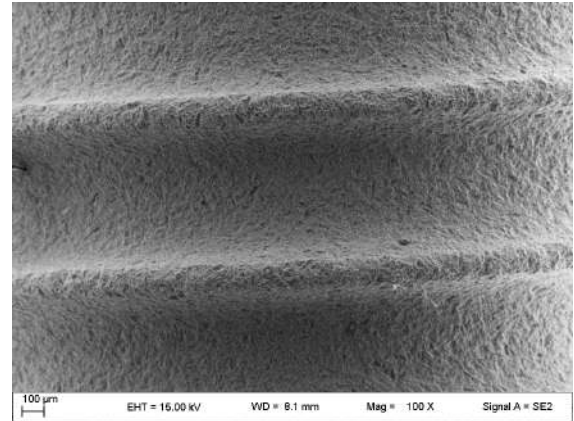
Al microscopio elettronico a scansione sono stati analizzati nove impianti, ovvero otto test e un controllo.

L'impianto controllo presentava una morfologia tipicamente microporosa come risultato del trattamento di superficie a cui i campioni sono stati sottoposti durante il processo di lavorazione. Questo aspetto risulta essere apprezzabile ad ingrandimenti 100X e 1.000X. Con un ingrandimento 1000X è stato possibile osservare una certa irregolarità di superficie data dalla presenza di crateri di dimensione nell'ordine di 10µm che esprimevano la microrugosità.

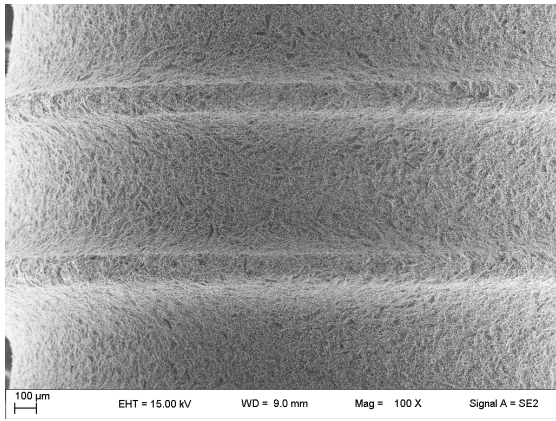
Dopo 5 e 15min dall'applicazione dei quattro agenti chimici sugli impianti, non sono state rilevate delle differenze strutturali significative rispetto al controllo. A 100X e 1000X di ingrandimento, la morfologia superficiale di tutti i campioni trattati risultava nel complesso omogenea, intervallata dalla presenza di valli disseminati su tutta la superficie.



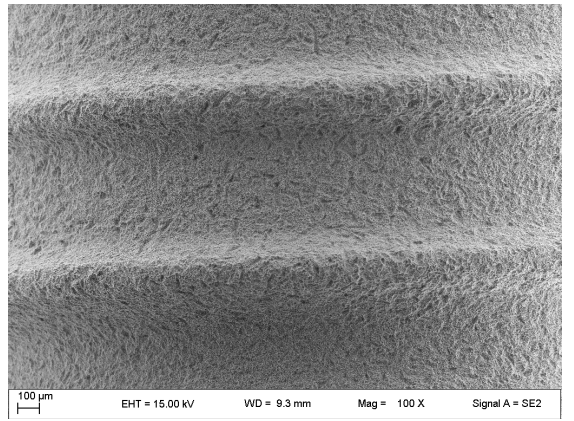
*Figura 9 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 100X*



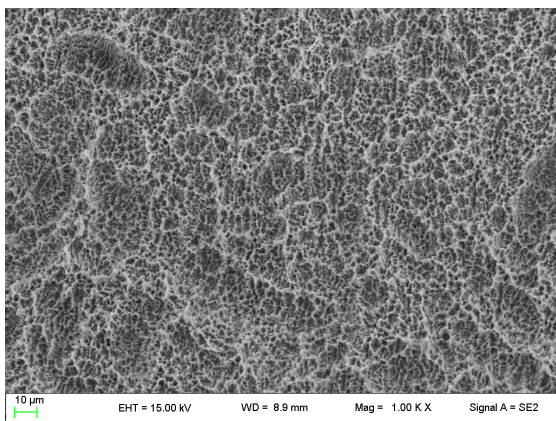
*Figura 10 Immagini al SEM di impianti trattati con EC-STER per 5 minuti con ingrandimento 100X*



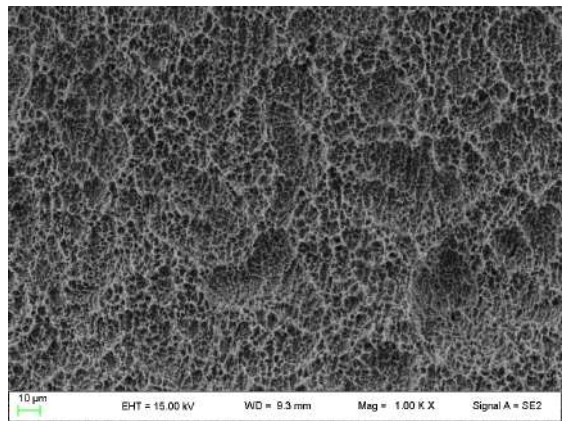
*Figura 11 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 100X*



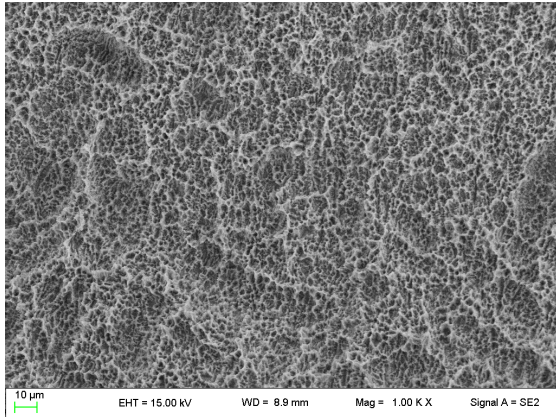
*Figura 12 Immagini al SEM di impianti trattati con EC-STER per 15 minuti con ingrandimento 100X*



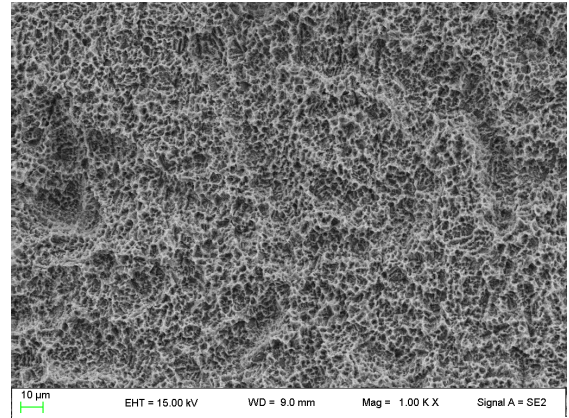
*Figura 13 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 1000X*



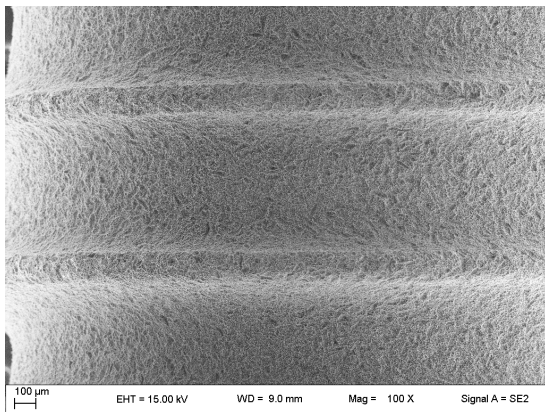
*Figura 14 Immagini al SEM di impianti trattati con EC-STER per 5 minuti con ingrandimento 1000X*



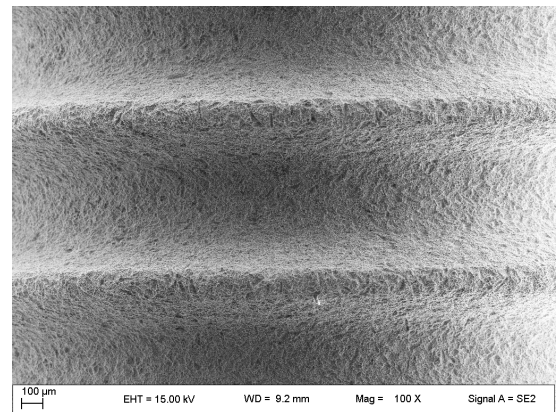
*Figura 15 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 1000X*



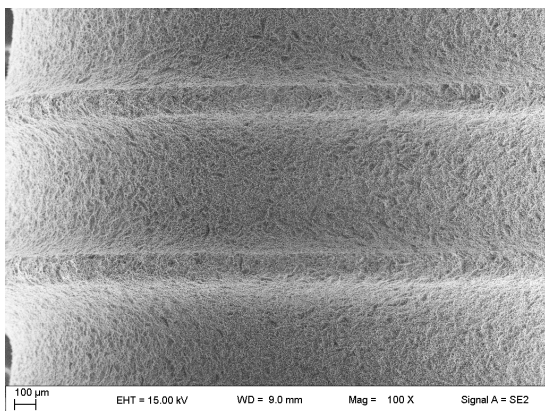
*Figura 16 Immagini al SEM di impianti trattati con EC-STER per 15 minuti con ingrandimento 1000X*



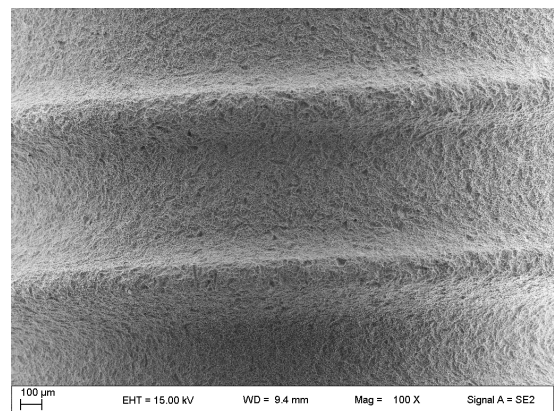
*Figura 17 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 100X*



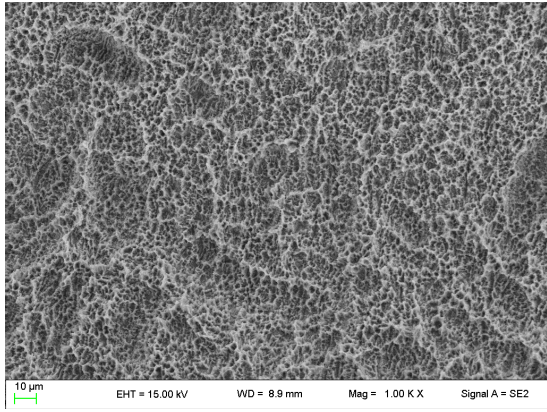
*Figura 18 Immagini al SEM di impianti trattati con argento colloidale per 5 minuti con ingrandimento 100X*



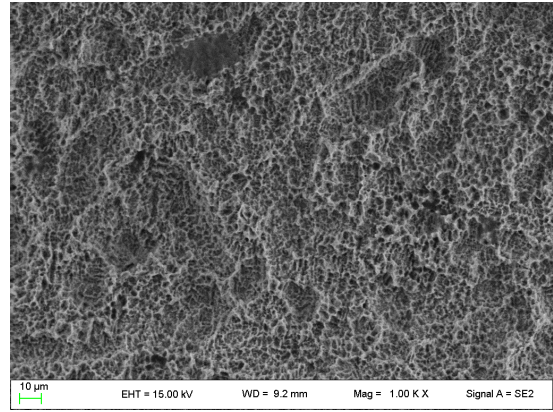
*Figura 19 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 100X*



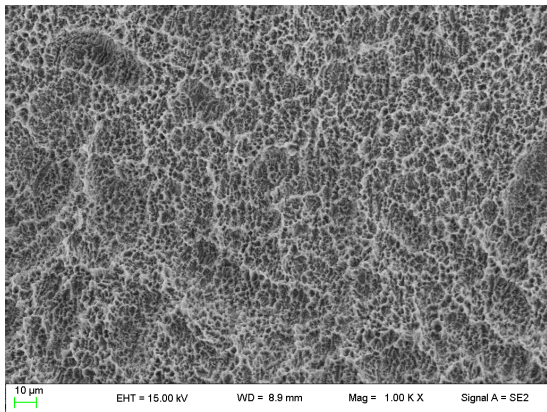
*Figura 20 Immagini al SEM di impianti trattati con argento colloidale per 15 minuti con ingrandimento 100X*



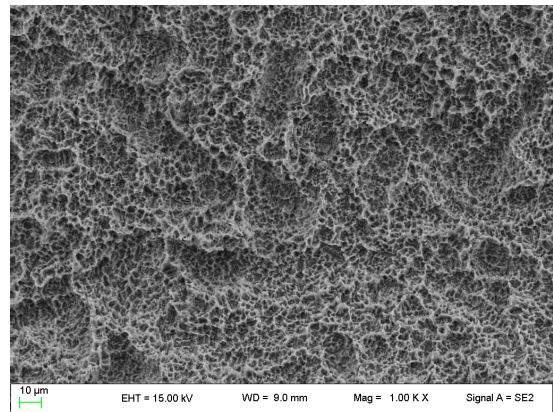
*Figura 21 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 1000X*



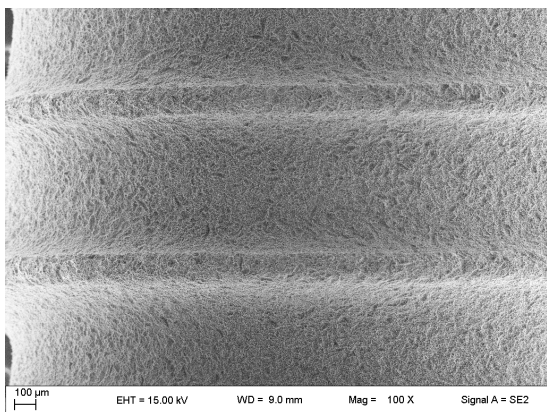
*Figura 22 Immagini al SEM di impianti trattati con argento colloidale per 5 minuti con ingrandimento 1000X*



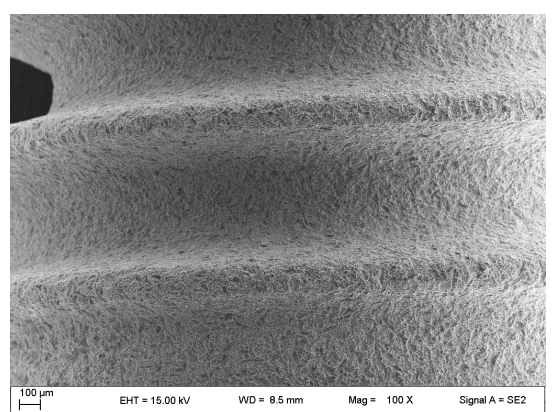
*Figura 23 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 1000X*



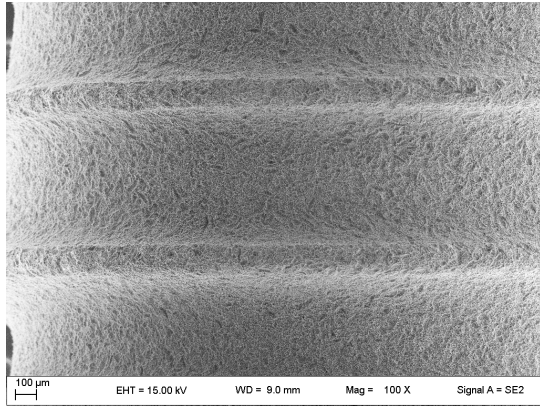
*Figura 24 Immagini al SEM di impianti trattati con argento colloidale per 15 minuti con ingrandimento 1000X*



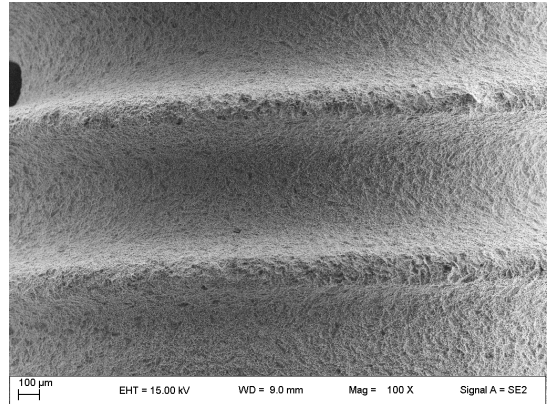
*Figura 25 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 100X*



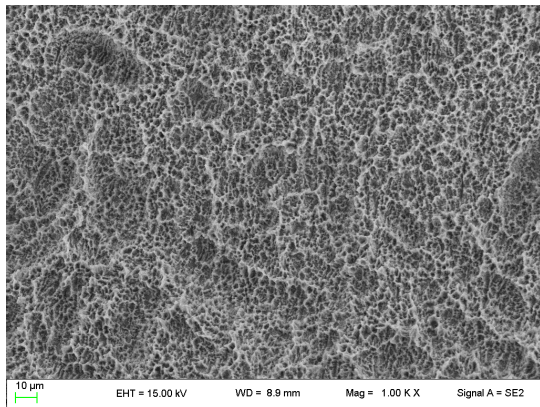
*Figura 26 Immagini al SEM di impianti trattati con acido ortofosforico per 5 minuti con ingrandimento 100X*



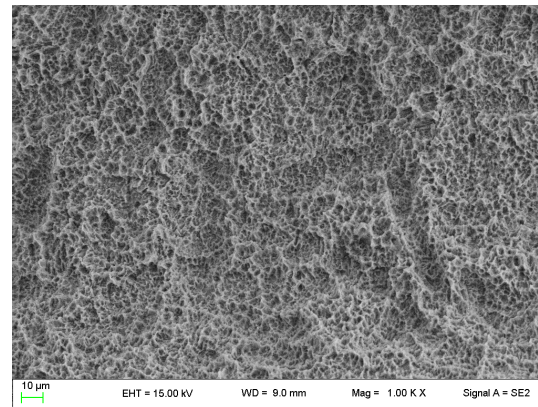
*Figura 27 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 100X*



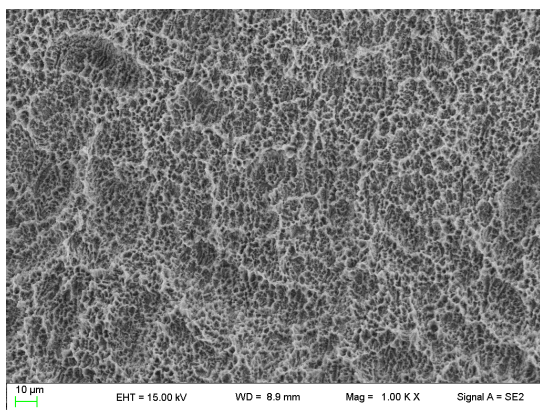
*Figura 28 Immagini al SEM di impianti trattati con acido ortofosforico per 15 minuti con ingrandimento 100X*



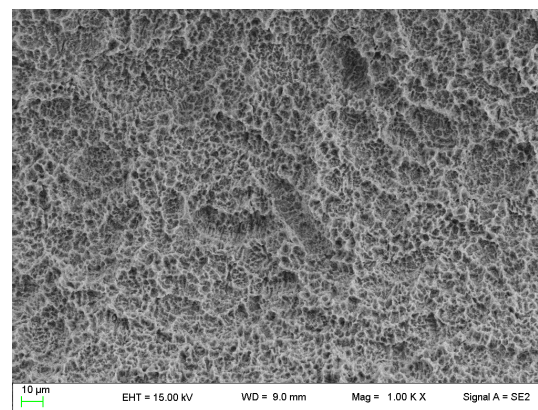
*Figura 29 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 1000X*



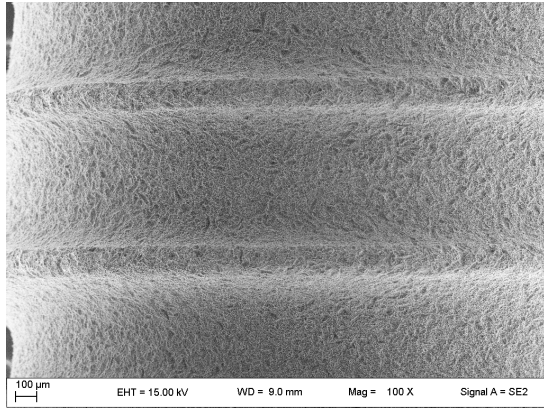
*Figura 30 Immagini al SEM di impianti trattati con acido ortofosforico per 5 minuti con ingrandimento 1000X*



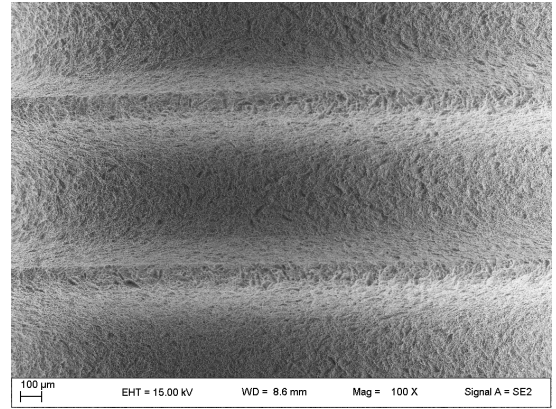
*Figura 31 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 1000X*



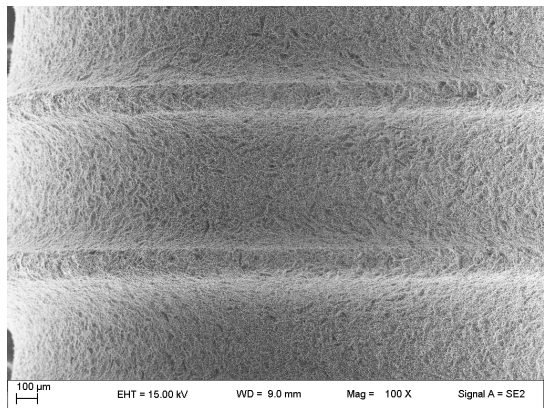
*Figura 32 Immagini al SEM di impianti trattati con acido ortofosforico per 15 minuti con ingrandimento 1000X*



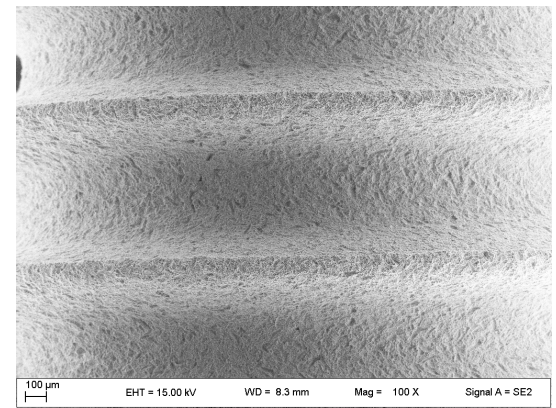
*Figura 33 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 100X*



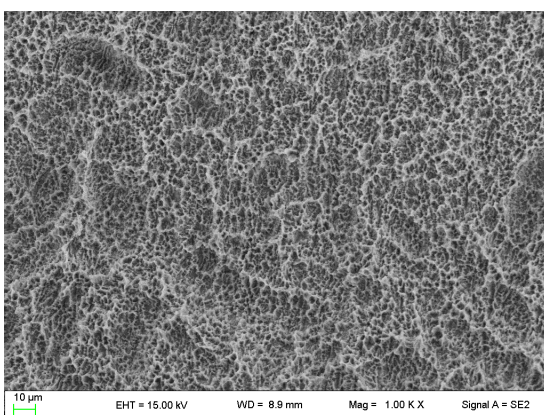
*Figura 34 Immagini al SEM di impianti trattati con clorexidina per 5 minuti con ingrandimento 100X*



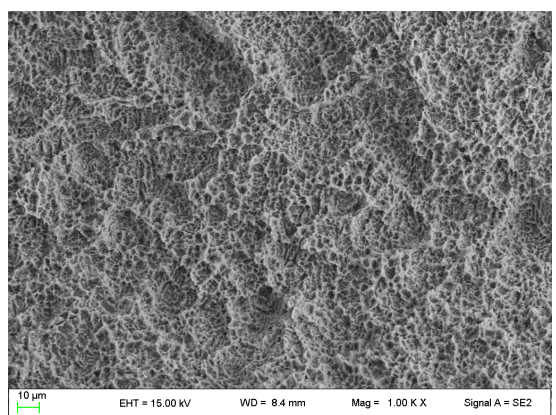
*Figura 35 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 100X*



*Figura 36 Immagini al SEM di impianti trattati con clorexidina per 15 minuti con ingrandimento 100X*

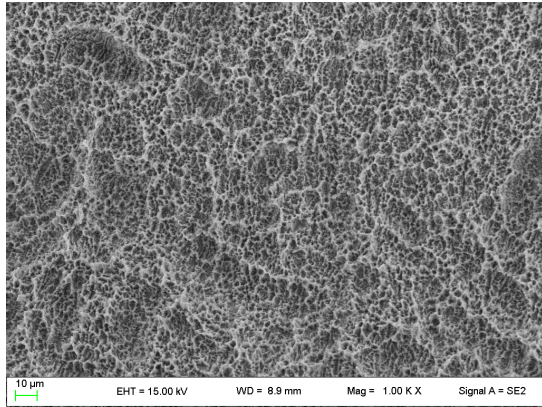


*Figura 37 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 1000X*

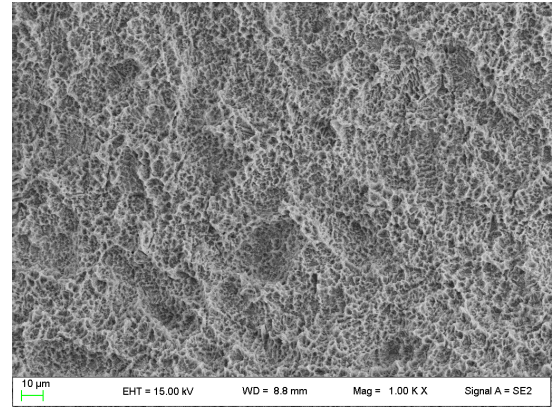


*Figura 38 Immagini al SEM di impianti trattati con clorexidina per 5 minuti con ingrandimento 1000X*





*Figura 39 Immagini al SEM dell'impianto controllo con ingrandimento 1000X*



*Figura 40 Immagini al SEM di impianti trattati con clorexidina per 15 minuti con ingrandimento 1000X*

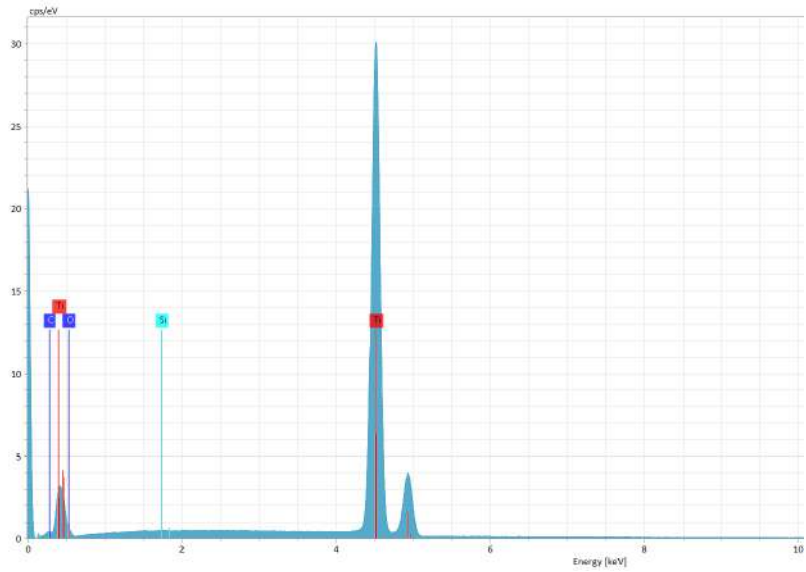
Infine è stata condotta una microanalisi di superficie per ottenere la caratterizzazione chimica dei campioni, mediante spettroscopia a dispersione di energia.

Titanio, carbonio e ossigeno sono stati identificati come componenti prevalenti sulla superficie di tutti gli impianti.

La presenza di ossido e di biossido di titanio è dominante sulla superficie di tutti i campioni; ciò può essere spiegato dalla capacità del titanio di reagire con l'ossigeno in presenza di aria.

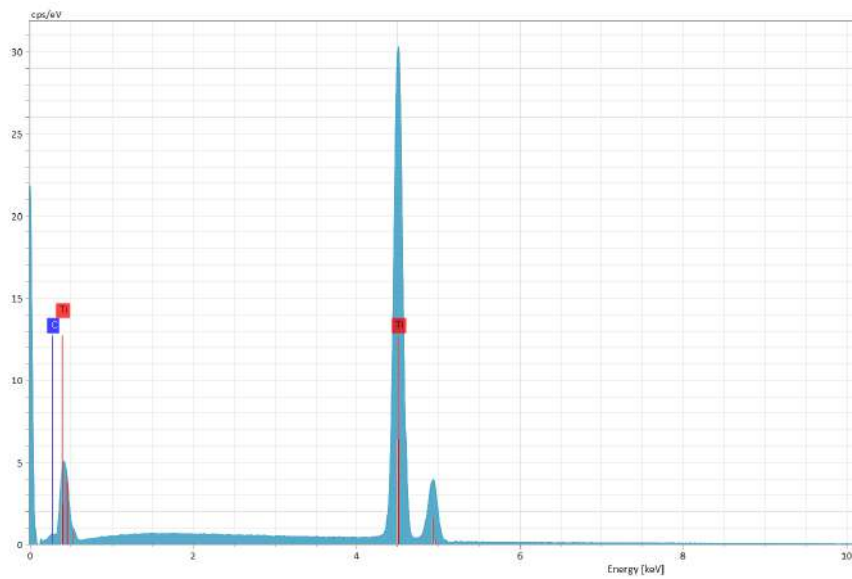
Inoltre si osserva una percentuale significativa di carbonio sugli impianti probabilmente dovuta all'utilizzo di frese al carburo di tungsteno durante la preparazione.

Infine su alcuni impianti sono state rilevate tracce di silicio come probabile residuo derivato dal processo di sabbiatura.



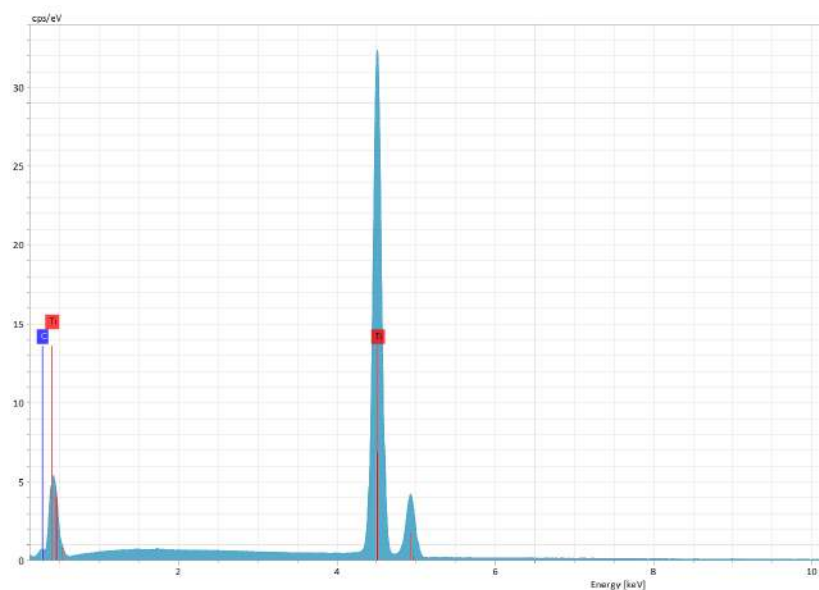
Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [% Atom %]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)
Carbon	6	3709	0,61449731	0,62878117	2,18971889	0,03510863
Oxygen	8	12218	6,15059942	6,29356887	16,4536136	0,33690613
Titanium	22	1296835	90,8937047	93,0065106	81,2507188	1,37222363
Silicon	14	1251	0,06952328	0,07113934	0,10594871	0,00945828
	Sum	97,7283247		100	100	

Figura 41 Spettro EDS della superficie dell'impianto controllo



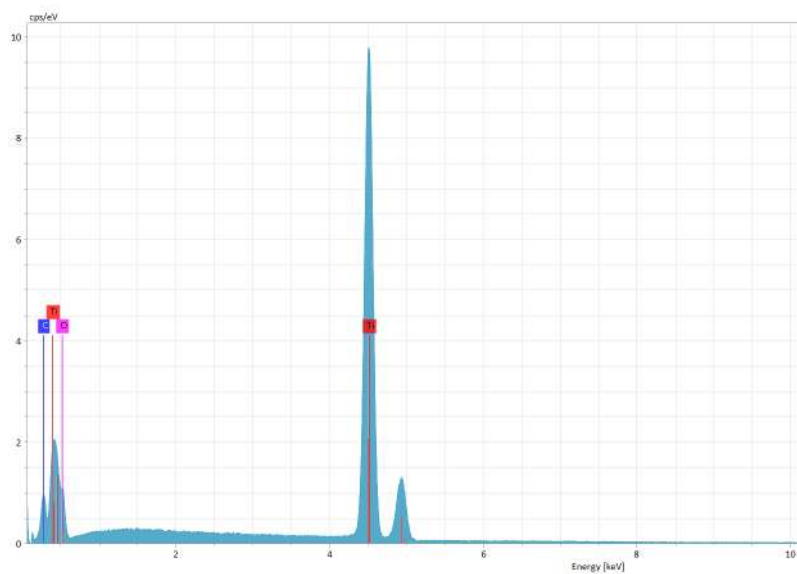
Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [% Atom %]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)
Carbon	6	4426	1,52266924	1,42909025	4,60685048	0,0806378
Titanium	22	639484	94,655947	88,8386576	71,8408518	1,71022091
Oxygen	8	10222	10,3695347	9,73225213	23,5522977	0,5685742
	Sum	106,548151		100	100	

Figura 42 Spettro EDS della superficie dell'impianto testato con EC-STER a 5 minuti



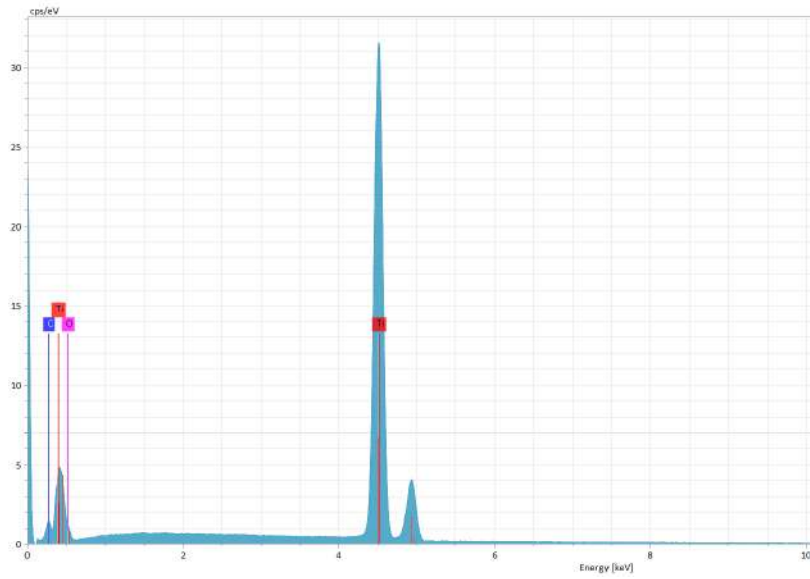
Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [9 Atom [%]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)
Carbon	6	6351	0,9958533	1,02767583	3,40137825	0,05295038   5,31708604
Titanium	22	1303839	87,4591039	90,2538626	74,9358455	1,31378865   1,50217484
Oxygen	8	18104	8,44848974	8,71846153	21,6627763	0,45954661   5,43939358
	Sum	96,9034469		100	100	

Figura 43 Spettro EDS della superficie dell'impianto testato con EC-STER a 15 minuti



Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [9 Atom [%]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)
Carbon	6	13133	7,33437698	7,18313457	18,2360563	0,35727171   4,87119367
Oxygen	8	11973	18,2266869	17,8508339	34,0212997	0,98755655   5,41819012
Titanium	22	299084	76,5444571	74,9660315	47,7426441	1,65924984   2,16769431
	Sum	102,105521		100	100	

Figura 44 Spettro EDS della superficie dell'impianto testato con argento colloidale a 5 minuti



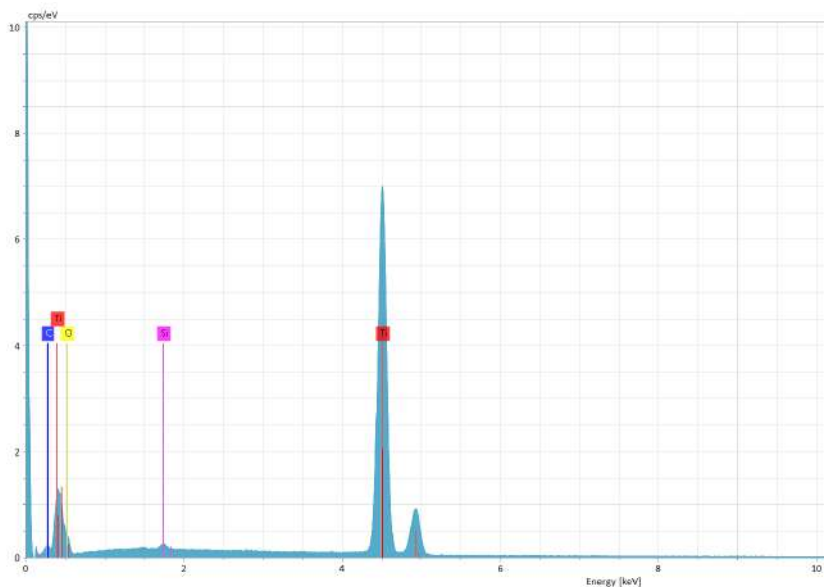
Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [9 Atom [%]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)
Carbon	6	14288	2,90854879	2,9606355	9,22141571	0,14389063
Oxygen	8	15666	9,43869748	9,60772704	22,4651222	0,51339229
Titanium	22	969755	85,8934452	87,4316375	68,3134621	1,37577749
	Sum		98,2406915	100	100	

Figura 45 Spettro EDS della superficie dell'impianto testato con argento colloidale a 15 minuti



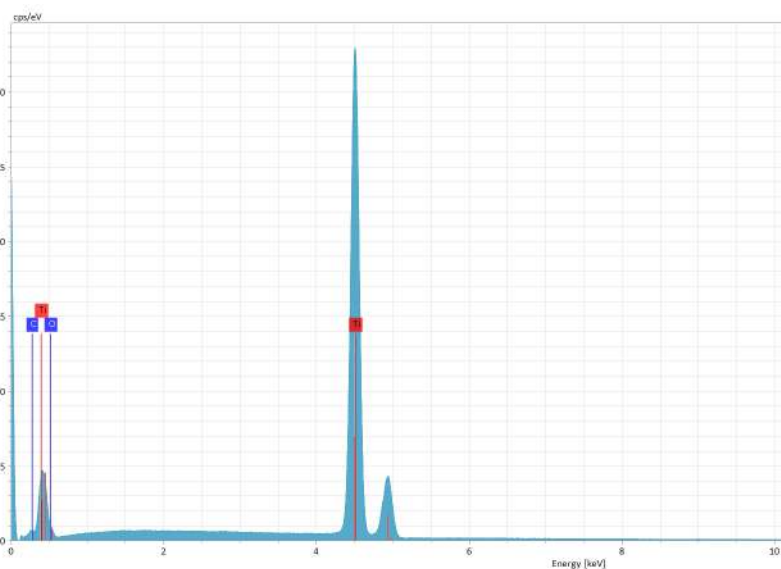
Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [9 Atom [%]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)
Carbon	6	1555	0,98797995	0,99106623	3,15975308	0,06872133
Titanium	22	322560	87,5258824	87,7992987	70,2209239	1,88565255
Silicon	14	1408	0,20371228	0,20434864	0,27862445	0,01839798
Oxygen	8	5990	10,9710148	11,0052865	26,3406986	0,62836756
	Sum		99,6885895	100	100	

Figura 46 Spettro EDS della superficie dell'impianto testato con acido ortofosforico a 5 minuti



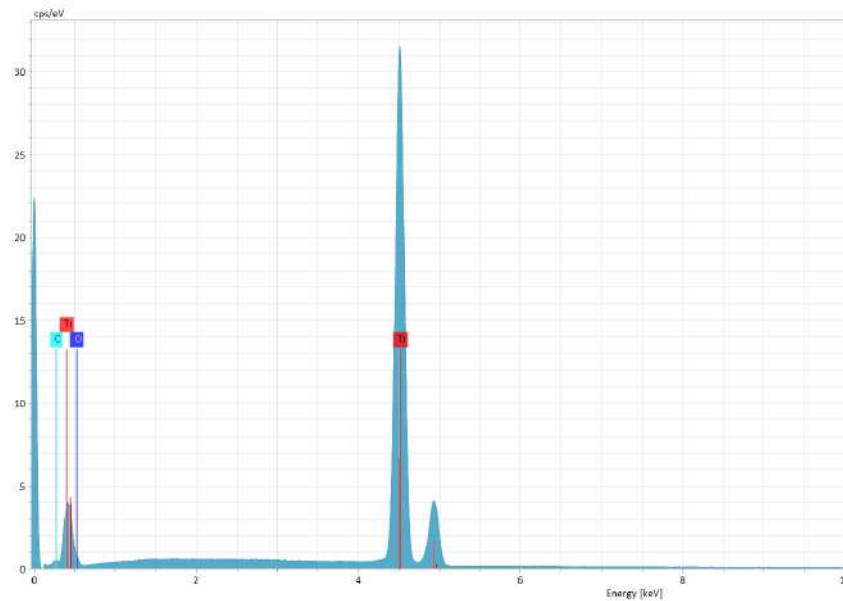
Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [9 Atom [%]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)				
Carbon	6	1392	1,33026856	1,28895456	3,8709488	0,09096996	6,83846554			
		5621	14,7910036	14,3316412	32,3110608	0,82592982	5,58400118			
Oxygen	8	2173	0,4851295	0,47006289	0,60371615	0,03071655	6,33161769			
Silicon	14	86,5988308	83,9093413	63,2142742	2,11727285	2,44492082				
		Sum	103,205233	100	100					

Figura 47 Spettro EDS della superficie dell'impianto testato con acido ortofosforico a 15 minuti



Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [9 Atom [%]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)				
Carbon	6	5356	0,99039102	1,0315303	3,43973869	0,05328865	5,38056669			
Titanium	22	1104168	87,0407709	90,6563072	75,8344448	1,35180494	1,55307096			
Oxygen	8	14338	7,90730029	8,23575707	20,6168571	0,43135212	5,45511236			
Silicon	14	1404	0,07335827	0,07640546	0,10895944	0,00927694	12,646077			
		Sum	96,0118205	100	100					

Figura 48 Spettro EDS della superficie dell'impianto testato con cloxidine a 5 minuti



Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [9 Atom [%]	abs. error [%]	rel. error [%] (1 sigma)
Carbon	6	4121	0,71378535	0,74140926	2,5472041	0,04019263
Titanium	22	1209814	88,83573	92,2737251	79,5259411	1,35596815
Oxygen	8	12709	6,64798098	6,90526177	17,8098949	0,36433929
Silicon	14	1434	0,07663794	0,07960387	0,11695988	0,00947377
		Sum	96,2741342	100	100	

Figura 49 Spettro EDS della superficie dell'impianto testato con clorexidina a 15 minuti

## 2.4. Discussione

L'obiettivo della prima fase dello studio sperimentale mirava a valutare e confrontare l'assetto superficiale degli impianti dopo l'applicazione di quattro agenti chimici.

Da studi scientifici precedenti era stato osservato che le applicazioni di clorexidina e acido ortofosforico sugli impianti non comportavano alterazioni strutturali, esito che è stato confermato anche durante quest'ultima analisi di superficie. Allo stesso modo, dopo aver impiegato l'argento colloidale, è stato ottenuto un buon risultato. Come infatti ci si attendeva, l'agente antibatterico non ha arrecato una compromissione della tessitura dell'impianto. Aveva invece destato preoccupazione l'utilizzo di EC-STER, in quanto si temeva potesse corrodere lo strato superficiale del dispositivo medico, essendo una sostanza a carattere riducente. Contrariamente a quanto si temeva, non sono state riscontrate delle modifiche significative sulla superficie degli impianti trattati.

Dunque possiamo concludere affermando che EC-STER e argento colloidale sono risultati idonei per procedere con la seconda fase sperimentale di questo studio.

### 3. TEST AD ATTIVITÀ ANTIMICROBICA

#### 3.1. *Materiali e metodi*

La seconda fase sperimentale mirava ad indagare, con uno studio preliminare in vitro, l'effetto di EC-STER e argento colloidale su biofilm pre-formati di batteri aerobi prelevati da siti implantari.

Per l'esecuzione dei test di attività antimicrobica sono stati acquisiti sette campioni da cinque pazienti reclutati presso il reparto di chirurgia maxillo facciale dell'ospedale San Filippo Neri di Roma.

I criteri di inclusione dei partecipanti allo studio prevedevano una diagnosi di mucosite perimplantare in almeno un sito implantare.

Da tali siti è stato prelevato l'essudato infetto mediante l'uso di brush che sono stati conservati in Eppendorf sterili da 1,5-2mL. I campioni prelevati sono stati mantenuti ad una temperatura di 4°C e trasportati il giorno successivo alla sezione di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera di Perugia, dove sono stati condotti i test di attività antimicrobica con EC-STER e argento colloidale.



*Figura 50 L'essudato infetto è stato prelevato mediante appositi brush*

Sotto una cappa a flusso laminare, che ha permesso di svolgere il seguente lavoro in condizioni di assoluta sterilità, i brush sono stati estratti e immersi in tubi da centrifuga contenenti un volume di 500  $\mu$ l di terreno BHI (Brain Heart Infusion) sterile, precedentemente preparato.

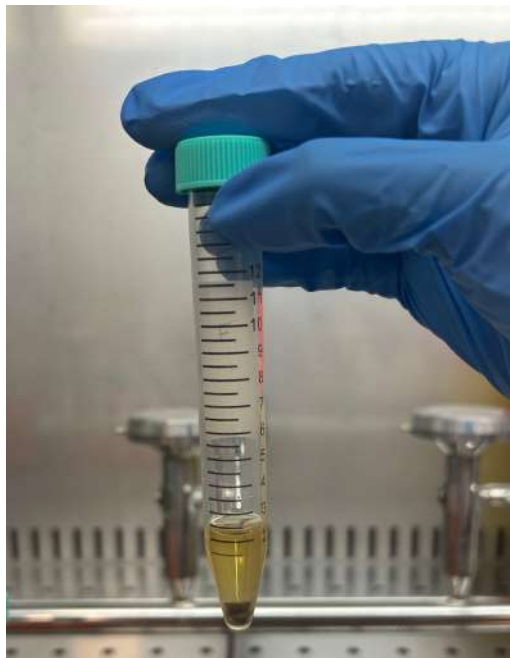
Successivamente sono stati vortexati per 10s e i terreni ottenuti sono stati uniti in una provetta da 50mL per la realizzazione di un *pull* di batteri.

Si è poi proseguito con una diluizione della sospensione batterica ottenuta fino a raggiungere un volume finale di 20mL.

La fase successiva ha previsto la preparazione di tubi da centrifuga da 15mL in cui sono stati distribuiti 2mL di terreno. A parte è stata conservata un'aliquota per la semina. All'interno dei tubi da centrifuga sono stati aggiunti gli impianti TS III Osstem, estratti dalla confezione con una pinzetta sterile. In totale, per la sperimentazione, sono stati utilizzati 10 impianti dentali.

A seguire il biofilm è stato fatto crescere sugli impianti per cinque giorni in incubatrice, ad una temperatura di 37°C.

Ogni giorno i tubi da centrifuga sono stati agitati per pochi secondi mediante un vortex, per favorire una disposizione omogenea del biofilm tra le spire degli impianti.



*Figura 51 Gli impianti sono stati posizionati in 2mL di terreno sterile e incubati per 5 giorni a 37°C per permettere la crescita del biofilm*



Terminato il periodo d'incubazione, gli impianti sono stati lavati immergendoli in H<sub>2</sub>O distillata sterile e aggiunti in nuovi tubi da centrifuga.

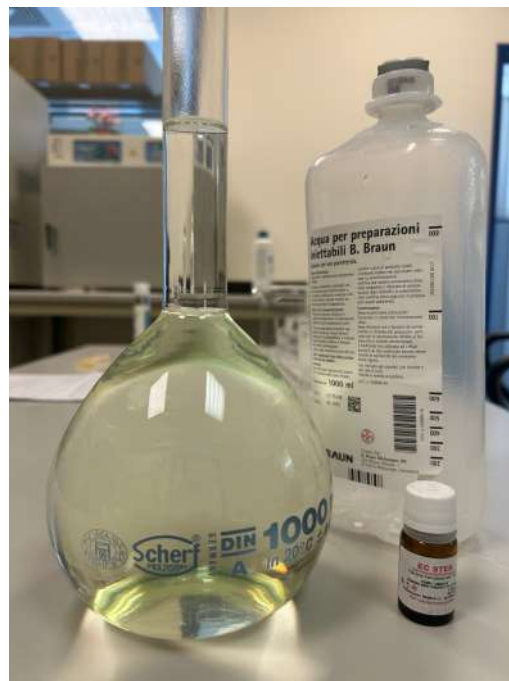
In un secondo tempo, gli impianti dentali infetti sono stati numerati e ripartiti in tre diverse categorie, in base al trattamento applicato:

- Gli impianti 1,2,3 non sono stati trattati (H<sub>2</sub>O distillata sterile):
- Gli impianti 4,5,6 sono stati trattati con EC-STER;
- Gli impianti 7,8,9 sono stati trattati con argento colloidale;
- L'impianto numero 10 è stato usato come controllo negativo.

In seguito sono state preparate nove Eppendorf all'interno delle quali inserire le sostanze decontaminanti da testare.

L'EC-STER in polvere è stato diluito in 1L di H<sub>2</sub>O distillata sterile e lasciato sciogliere per 10min, così da garantire la sua attivazione prima di essere utilizzato.

La soluzione ottenuta è stata impiegata durante la stessa giornata in cui è stata preparata, ma i dati forniti dal produttore indicano che può essere conservata al chiuso fino ad un periodo di 14giorni.



*Figura 52 Miscelazione di EC-STER in 1L di H<sub>2</sub>O iniettabile*

Prima di procedere con il passaggio successivo, è stato misurato il pH della soluzione di EC-STER all'interno delle Eppendorf e della soluzione preparata inizialmente, mediante l'impiego di cartine tornasole.

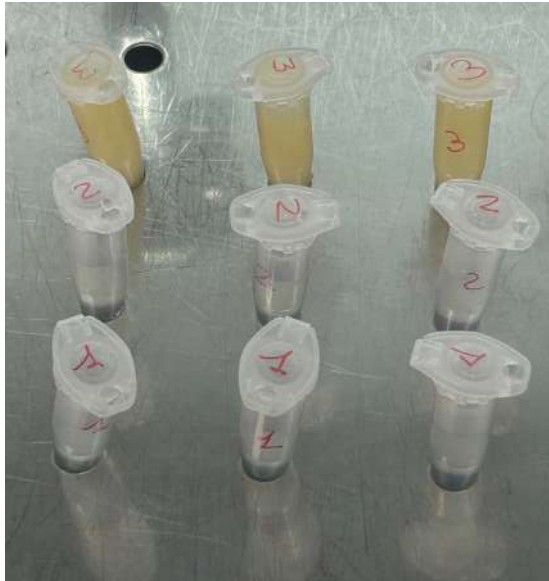
Il valore di pH della soluzione si è sempre mantenuto in un range di 8.5-9, in linea con il valore che la sostanza doveva possedere per svolgere la sua attività con efficacia.



*Figura 53 Valutazione del pH della soluzione EC-Ser*

L'argento colloidale in gel non ha invece richiesto alcuna preparazione precedente, ma è stato direttamente trasferito in tre Eppendorf.

In particolare il gruppo di provette 1\* (le provette 1,2,3) è stato riempito con H<sub>2</sub>O distillata sterile, il gruppo di provette 2\* (le provette 3,4,5) con EC-STER, infine il gruppo di provette 3\* ( le provette 6,7,8) con argento colloidale.



*Figura 104 Il gruppo di provette 1 conteneva H<sub>2</sub>O distillata sterile, il gruppo 2 conteneva EC-STER, infine il gruppo 3 conteneva argento colloidale*

Gli impianti infetti sono stati immersi nelle sostanze sterilizzanti e coperti per il loro intero volume per 120s.

Successivamente sono stati risciacquati in H<sub>2</sub>O distillata sterile e inseriti in provette all'interno delle quali era stato precedentemente aggiunto 1 ml di H<sub>2</sub>O distillata sterile.

I tubi da centrifuga sono stati quindi sonicati in un bagno ad ultrasuoni a 47 kHz, 234 W per 6min con il fine di garantire il distacco dei batteri rimasti sull'impianto e portarli in sospensione.

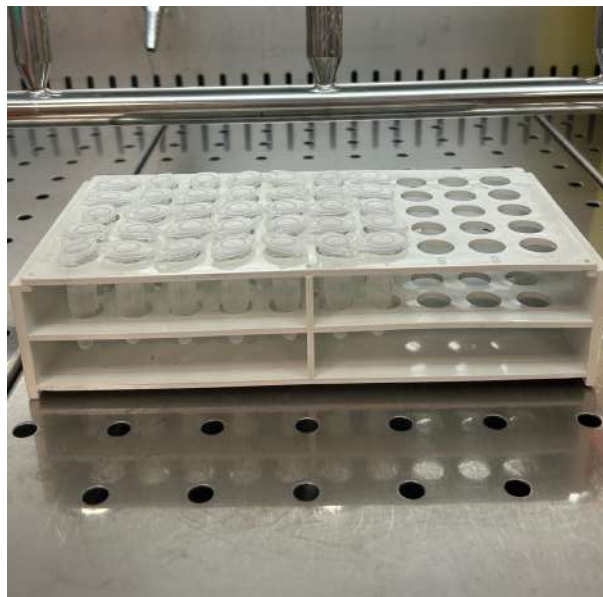


*Figura 55 I tubi che contenevano gli impianti vengono sonicati in un bagno ad ultrasuoni a 47kHz, 234W per 6min*

Per i nove impianti infetti sono state eseguite delle diluizioni decimali scalari (campione non diluito (A), diluito 1:10 (B), 1:100 (C), 1:1.000 (D), 1:10.000 (E), 1:100.000 (F) e 1:1.000.000 (G)) dal liquido di ogni provetta, mentre per il controllo negativo è stato sufficiente utilizzare la sospensione più concentrata.

Un'aliquota di 100 $\mu$ L di sospensione sonicata è stata collocata in 900 $\mu$ L di H<sub>2</sub>O distillata sterile così da allestire le successive diluizioni scalari.

Anche la sospensione madre, che era stata precedentemente conservata per valutare la conta batterica di partenza, è stata diluita allo stesso modo.



*Figura 56 All'interno delle provette è stata eseguita la diluizione scalare delle sospensioni*

In seguito, 50  $\mu$ L di campione non diluito (A) e di campione con diluizione 1:10 (B) sono stati seminati in piastre Muller Hinton Agar.

Le piastre sono state identificate con dei numeri e con delle lettere di riferimento, corrispondenti agli impianti infetti e alla diluizione scelta.

A questo punto sono state incubate a 37°C in aerobiosi per 24h prima della valutazione delle colonie di batteri aerobi facoltativi e obbligati.



*Figura 57 Incubazione a 37°C delle piastre Muller Hinton Agar per 24h*

Il giorno successivo le piastre sono state rimosse dall'incubatrice e le colonie batteriche formate sono state contate e poi identificate con la tecnica MALDI-TOF.

In alcune piastre la concentrazione batterica ha determinato una fusione delle colonie tale da rendere impossibile il conteggio. Perciò si è rivelato necessario seminare alcuni campioni nuovamente a 37°C con diluizioni meno concentrate.

In particolare sono state scelte le diluizioni 1:100 (C) e 1:1000 (D) per le sospensioni 2, 11 e 8, le diluizioni 1:10 (B) e 1:100 (C) per la sospensione 7 e infine la soluzione non diluita (A) e la diluizione 1:10 (B) per la sospensione 1.

Dopo 72h le colonie sono state analizzate con la tecnologia MALDI-TOF.

La spettrofotometria di massa non è stata in grado di rilevare tutte le colonie, pertanto quest'ultime sono state prelevate con un'ansa e messe in subcultura in terreni BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood per 24h prima di procedere con il riconoscimento.

### 3.2. Spettrometria di massa MALDI-TOF

Il MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) è uno spettrometro di massa utilizzato come metodo di diagnosi in microbiologia clinica.

Il principio di questa tecnica consiste nella frammentazione e ionizzazione delle proteine ribosomiali che determinano il profilo proteico del microrganismo in esame, garantendo una rapida identificazione mediante la comparazione con banche dati di riferimento.

Lo strumento è provvisto di una sorgente di ionizzazione (MALDI) e di un analizzatore (TOF) che misura il tempo di volo, ovvero il tempo impiegato dagli ioni per percorrere uno stesso spazio dopo essere stati accelerati dal laser.

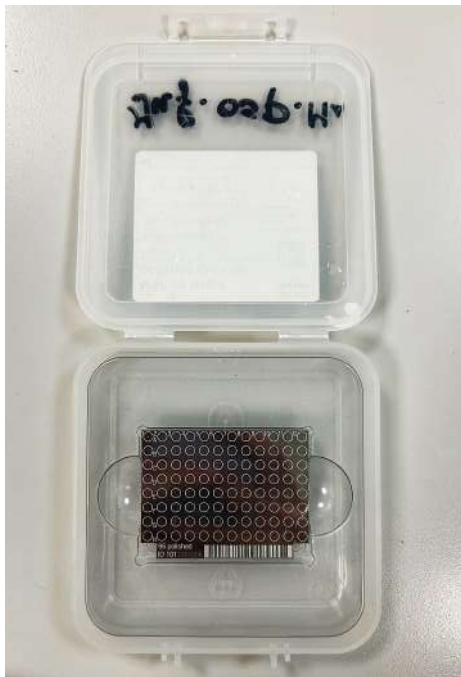


Figura 58 Piastra lavabile



Figura 59 MALDI-TOF

Una piccola quantità di una colonia isolata viene prelevata con uno stuzzicadenti e depositata direttamente su una piastra lavabile in metallo. Quest'ultima è dotata di diversi pozzetti sui quali possono essere spatolati fino ad un massimo di 96 campioni per volta.

Dopo alcuni minuti dalla deposizione del campione, viene aggiunto 1  $\mu$ L di matrice fluida, ovvero un solvente acido a basso PM che cristallizza le cellule e riesce a frammentarle dopo che sono state colpite dal raggio laser. Eventualmente 1  $\mu$ L di acido formico può essere addizionato, prima della matrice, per favorire l'apertura della parete batterica di microrganismi in cui è particolarmente rappresentata.

Una volta accertata l'asciugatura della miscela, la piastra viene inserita all'interno dello strumento e viene dato l'input per metterla in posizione.

Prima di iniziare, si attende che l'ambiente raggiunga il regime di vuoto e che gli ioni siano al livello prestabilito.

Durante l'analisi il laser pulsato irradia il campione, rompendo le proteine ribosomiali che volano attraverso il tubo dello strumento.

Il rilevatore è in grado di intercettare il tempo di volo impiegato dagli ioni nell'eseguire il tragitto all'interno del tubo e di convertire i risultati in picchi di spettrofotometria di massa.

Gli spettri acquisiti verranno subito confrontati con i riferimenti del database, portando all'identificazione di uno specifico microrganismo.

### 3.3. *Risultati*

Terminata la fase di incubazione, le piastre sono state analizzate. Inizialmente è stato eseguito il conteggio delle colonie individuate su ciascun impianto e il risultato è stato espresso come numero di unità formanti colonia per impianto dentale (CFU/impianto).

#### *Biofilm non trattati*

- Impianto 1: 29.720 CFU/impianto
- Impianto 2: 13.600.000 CFU/impianto
- Impianto 3: 92.400 CFU/impianto

#### *Biofilm trattati con EC-STER*

- Impianto 1: 0 CFU/impianto
- Impianto 2: 0 CFU/impianto
- Impianto 3: 0 CFU/impianto

### *Biofilm trattati con argento colloidale*

- Impianto 1: 524.000 CFU/impianto
- Impianto 2: 216.000 CFU/impianto
- Impianto 3: 440 CFU/impianto

Dall'osservazione delle piastre seminate con sospensioni di biofilm non trattati, è stato possibile individuare la formazione di numerose colonie batteriche diverse tra loro. In particolare è stata calcolata una media di 4.574.040 CFU/impianto.

Sulle piastre seminate con sospensioni di biofilm trattati con EC-Ster invece non è stata riscontrata alcuna crescita batterica. Dai risultati infatti è emerso che le superfici impiantari infette sono state completamente sterilizzate.

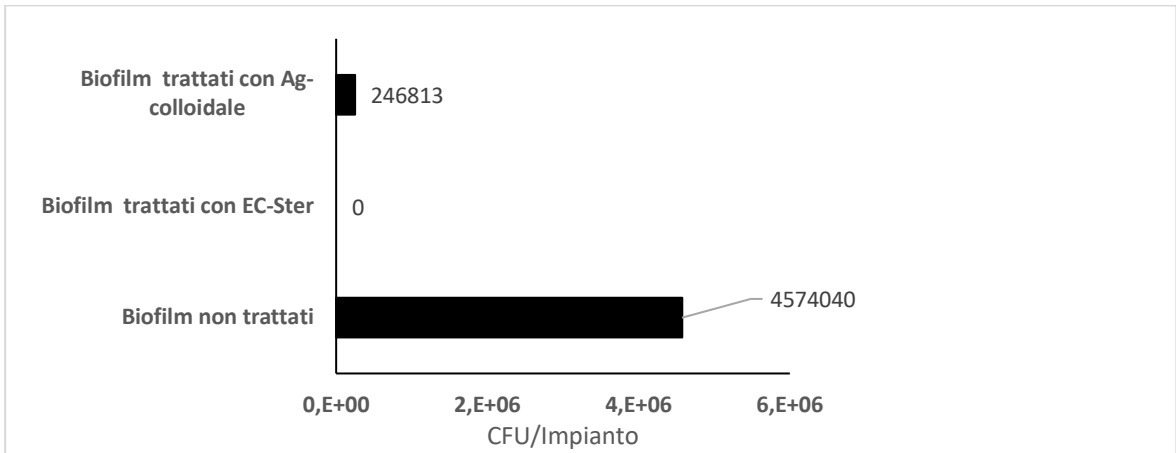
L'analisi delle piastre seminate con sospensioni di biofilm trattati con argento colloidale ha mostrato uno sviluppo batterico relativamente basso, con una media di 246.813 CFU/impianto.

L'impatto del trattamento è stato valutato complessivamente positivo sia nel gruppo di impianti trattati con EC-Ster sia nel gruppo di impianti trattati con argento colloidale. Infatti, si può notare che entrambi i trattamenti oggetto di studio hanno ridotto significativamente la carica batterica, rispetto al gruppo non trattato con alcuna sostanza. In media, EC-STER ha mostrato una riduzione della carica batterica del 100%, mentre nel caso dell'argento colloidale è stata calcolata una riduzione del 94,6% , rispetto agli impianti non trattati.

CFU/impianto						
	Impianto 1	Impianto 2	Impianto 3	Media	SD	%
<b>Biofilm non trattati</b>	29720	13600000	92400	4574040	7816773	100
<b>Biofilm trattati con EC-STER</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Biofilm trattati con Ag-colloidale</b>	524000	216000	440	246813	263136,6	5,395959

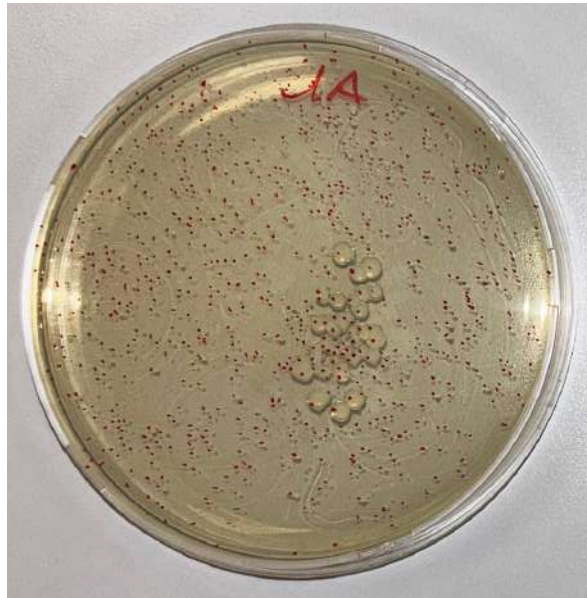
*Figura 60 Concentrazione di microrganismi presenti sugli impianti dentali non trattati e trattati con EC-STER e argento colloidale*





*Figura 61 Grafico che mostra la concentrazione di colonie batteriche presenti in media sugli impianti non trattati e trattati con EC-STER e argento colloidale*

Il grafico evidenzia in maniera chiara come EC-Ster abbia completamente sterilizzato la superficie implantare di tutti gli impianti infetti trattati. Inoltre, si nota chiaramente come anche il trattamento con argento colloidale sia riuscito a ridurre significativamente il biofilm, seppur non debellandolo del tutto.



*Figura 62 Piastra seminata con sospensione non diluita ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 1 con H2O distillata sterile*



*Figura 63 Piastra seminata con sospensione diluita 1:100 ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 2 con H<sub>2</sub>O distillata sterile*



*Figura 64 Piastra seminata con sospensione diluita 1:10 ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 3 con H<sub>2</sub>O distillata sterile*



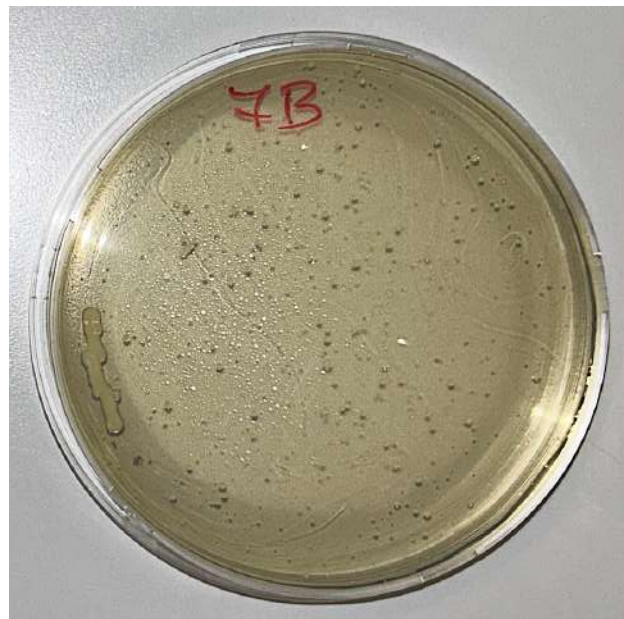
*Figura 65 Piastra seminata con sospensione diluita 1:10 ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 4 con EC-STER*



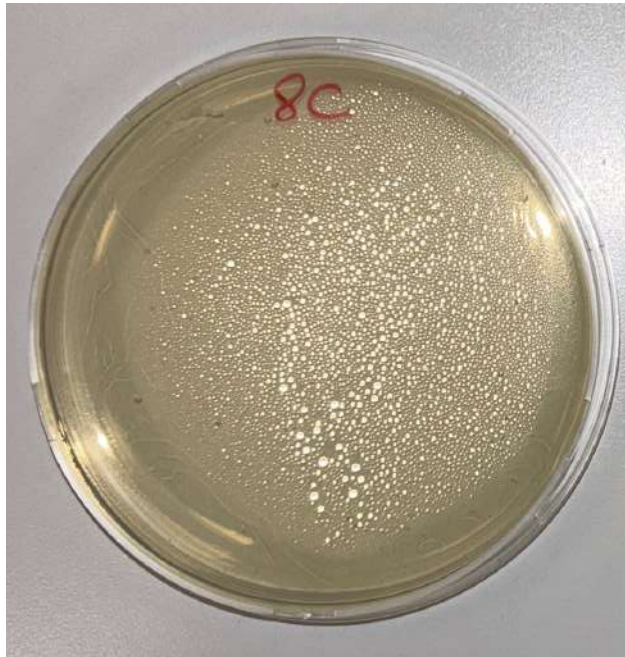
*Figura 66 Piastra seminata con sospensione non diluita e diluita 1:10 ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 5 con EC-STER*



*Figura 67 Piastra seminata con sospensione non diluita e diluita 1:10 ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 6 con EC-STER*



*Figura 68 Piastra seminata con sospensione diluita 1:10 ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 7 con argento colloidale*



*Figura 69 Piastra seminata con sospensione non diluita 1:100 ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 8 con argento colloidale*



*Figura 70 Piastra seminata con sospensione non diluita ottenuta dal trattamento dell'impianto numero 9 con argento colloidale*

Successivamente, il riconoscimento delle colonie è stato condotto mediante la tecnologia MALDI-TOF.

Le specie batteriche individuate sugli impianti infetti non trattati sono state le seguenti:

- *Enterobacter ludwigii*
- *Neisseria flavescens/subflava*
- *Streptococcus mitis/oralis*
- *Streptococcus salivarius*
- *Streptococcus parasanguis*

*Streptococcus mitis/oralis* e *Enterobacter ludwigii* sono state le colonie più rappresentate all'interno di biofilm non trattati.

Numero di colonie				
SPECIE BATTERICA				Somma
<i>Enterobacter ludwigii</i>	231	8	44	283
<i>Neisseria flavescens/subflava</i>	54			54
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	645			645
<i>Streptococcus salivarius</i>	33			33
<i>Streptococcus parasanguis</i>	70			70

Figura 71 Numero di colonie osservate all'interno di biofilm non trattati

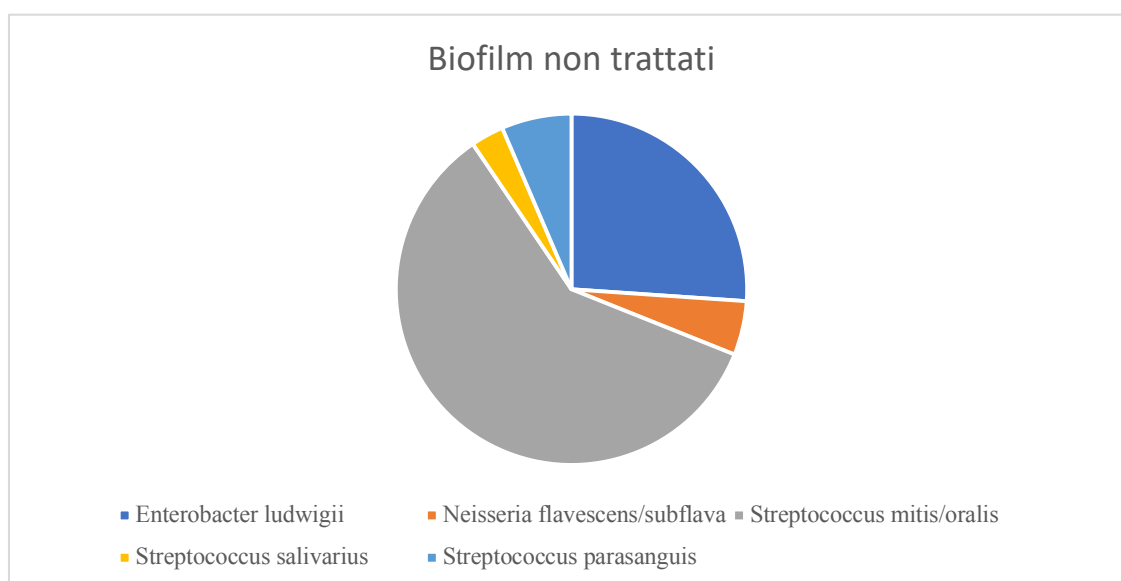


Figura 72 Grafico a torta che mostra la composizione di biofilm non trattati

Dall'analisi condotta su biofilm trattati con argento colloidale sono state identificate le seguenti specie batteriche:

- *Enterobacter ludwigii*
- *Neisseria flavescens/subflava*
- *Streptococcus mitis/oralis*
- *Enterobacter kobei*
- *Neisseria sicca*

Le colonie dominanti presenti sono state quelle di *Streptococcus mitis/oralis*.

Numero di colonie				
SPECIE BATTERICA				Somma
<i>Enterobacter ludwigii</i>	58			58
<i>Neisseria flavescens/subflava</i>	19	47		66
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	353			353
<i>Enterobacter kobei</i>	11			11
<i>Neisseria sicca</i>	7			7

Figura 73 Numero di colonie osservate all'interno di biofilm trattati con argento colloidale

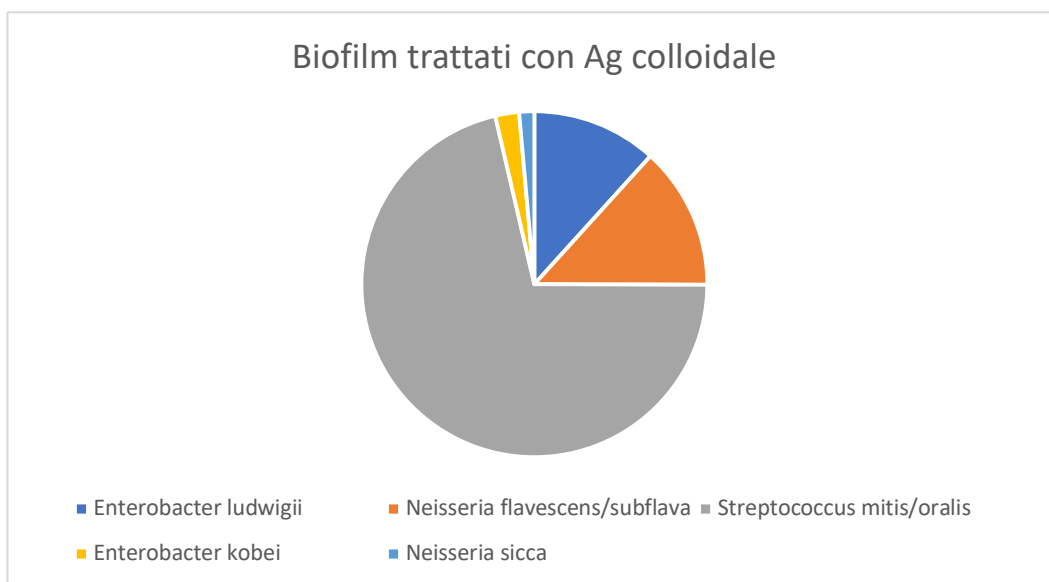


Figura 74 Grafico a torta che mostra la composizione di biofilm trattati con argento colloidale

La tecnologia MALDI-TOF ha consentito di identificare *Streptococcus pneumoniae* sulla piastra 7B, seminata con una sospensione di biofilm trattato con argento colloidale. Tale esito può trovare spiegazione nella struttura proteica della specie batterica, poiché è molto simile a quella di *Streptococcus mitis oralis*. Per eseguire un'ulteriore verifica, è stato quindi condotto il test Binax NOW che ha infine escluso la presenza di *Streptococcus pneumoniae*. Questo test garantisce una rapida diagnosi, evidenziando l'eventuale presenza dell'antigene, mediante un tampone che viene prelevato e miscelato con il reagente, prima di essere depositato sulla card.

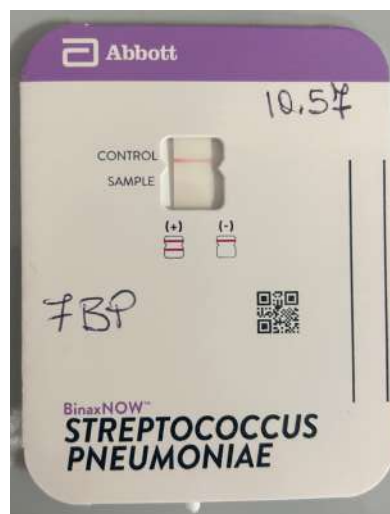
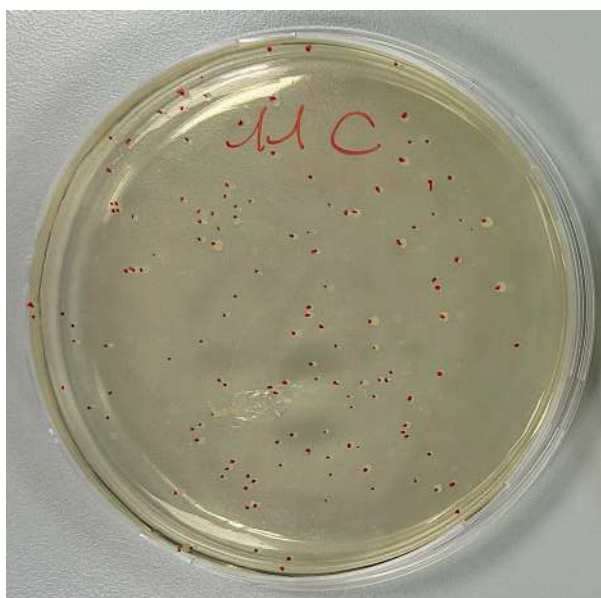


Figura 75 Valutazione della presenza di *Streptococcus pneumoniae* tramite test Binax NOW



Infine l'aliquota della sospensione madre che era stata conservata, è stata analizzata come conferma della presenza di batteri nel terreno di coltura ottenuto dai brush infetti prelevati dai pazienti. È stato possibile osservare la formazione di numerose colonie batteriche.



*Figura 76 Piastra seminata con l'aliquota del terreno di partenza con diluizione 1:100*

#### *1.4. Discussione*

Nell'ambito di questo lavoro, è stata analizzata la complessa gestione terapeutica delle malattie perimplantari, concentrando l'attenzione sulla ricerca di nuove sostanze sterilizzanti in grado di decontaminare gli impianti dentali.

L'obiettivo primario della ricerca mirava ad indagare, con uno studio preliminare in vitro, l'efficacia di EC-STER e argento colloidale nella rimozione di batteri aerobi prelevati da siti di pazienti affetti da mucosite perimplantare, attraverso dei test ad attività antimicrobica eseguiti su impianti dentali e condotti presso la sezione di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera di Perugia.

I dati raccolti hanno permesso di analizzare la carica batterica residua in biofilm trattati EC-STER e argento colloidale, oltre a confrontarla con quella di biofilm non trattati.

Uno dei risvolti più sorprendenti emersi dai test ad attività antimicrobica è stata l'efficacia di EC-STER nella sterilizzazione degli impianti contaminati. Da studi scientifici precedenti

era stato provato che questa sostanza riducente avesse ottime potenzialità nel debellare una vasta gamma di microrganismi, una volta applicata su dispositivi medici e superfici. In accordo con quanto citato, i risultati di questo studio hanno dimostrato che tutte le piastre seminate con le sospensioni di biofilm trattati con EC-STER non presentavano crescita batterica (0%). Questo esito è estremamente promettente in quanto suggerisce che potrebbe rappresentare una soluzione efficace nel trattamento delle malattie perimplantari.

L'azione antibatterica dell'argento colloidale è nota da tempo in campo medico. Durante l'esecuzione dei test, è stato interessante notare che ha limitato significativamente lo sviluppo di colonie batteriche sulle piastre, dopo il trattamento degli impianti infetti. È stata appurata una crescita microbica del 5,4% rispetto ai biofilm non trattati, quindi con valori decisamente inferiori. Per tale motivo l'argento colloidale potrebbe essere considerato un'opzione valida per il trattamento delle malattie perimplantari. Tuttavia, è importante notare che gli esiti ottenuti hanno evidenziato una variazione significativa di batteri presenti, in termini quantitativi tra i diversi campioni, dimostrando che l'antibatterico non ha agito allo stesso modo nella rimozione delle colonie. Ad esempio sulle piastre 7B rispetto alle piastre 8C, 9A è stata osservata una crescita microbica maggiore, motivo per cui sono necessari ulteriori studi per comprendere meglio la sua attività e per escludere eventuali errori operativi. Inoltre sarebbe opportuno confrontare i risultati ottenuti con quelli di altri agenti antibatterici, utilizzati comunemente per la terapia perimplantare, così da stabilire le condizioni di utilizzo e le potenziali applicazioni dell'argento colloidale nella gestione terapeutica della malattia.

Un contributo importante per questa indagine sperimentale è stato fornito dall'utilizzo della tecnologia MALDI-TOF per l'identificazione delle colonie batteriche. I risultati ottenuti hanno permesso di comprendere la loro distribuzione all'interno dei biofilm trattati e non trattati.

Sebbene sia indiscusso il contributo significativo che questa tesi fornisce nell'ambito della decontaminazione implantare, va tenuto in considerazione che si tratta di uno studio preliminare e pertanto è opportuno riconoscere i limiti intrinseci del lavoro svolto. Per trarre conclusioni definitive si potrebbe innanzitutto suggerire di eseguire dei test ripetibili, per escludere errori procedurali. Inoltre sarebbe auspicabile aumentare la variabilità del prelievo, arruolando un numero maggiore di pazienti, e utilizzare un campione più vasto di impianti. Un altro aspetto da tenere in nota potrebbe essere quello di eseguire il prelievo da tasche profonde, oltre che da siti superficiali, di pazienti affetti da mucosite e perimplantite. Questo

permetterebbe di ottenere una visione più completa dell'ecosistema batterico responsabile delle malattie perimplantari e di dimostrare l'impatto che le sostanze sterilizzanti possono avere su una più ampia gamma di microrganismi coinvolti. Infine garantirebbe una comprensione più completa delle potenzialità delle sostanze testate e delle implicazioni cliniche che possono avere su pazienti affetti da malattie perimplantari.

## CONCLUSIONI FINALI

Tenuti in considerazione i dati presenti in letteratura, questo studio si è proposto di valutare la capacità decontaminante di EC-STER e argento colloidale su superfici di impianti infetti da patogeni presenti in corso di malattia perimplantare.

I risultati ottenuti dalla microscopia elettronica a scansione (SEM) hanno evidenziato che l'applicazione delle due sostanze antimicrobiche su impianti dentali non arrecava alterazioni alla tessitura superficiale.

Nei limiti del presente studio, gli esiti ottenuti dai test ad attività antimicrobica indicano che il trattamento con EC-STER rappresenta un efficace approccio terapeutico per debellare i batteri aerobi coinvolti nella mucosite perimplantare. Infatti, dai dati raccolti, emerge che EC-STER è stato in grado di sterilizzare il 100% della superficie degli impianti dentali infetti. Nel caso di trattamenti con l'argento colloidale è stata osservata una significativa riduzione batterica (94,6%) sulla superficie implantare trattata, rispetto a quella non sottoposta ad alcuna applicazione. Pertanto anche l'argento colloidale può rappresentare una valida alternativa terapeutica.

È nostra convinzione che il seguente elaborato possa offrire un contributo significativo per migliorare la gestione delle malattie perimplantari, proponendo EC-STER e argento colloidale come trattamenti decontaminanti efficaci e risolutivi. Per confermare i risultati preliminari acquisiti, sarebbe opportuno promuovere lo svolgimento di ulteriori studi in vitro e allestire degli studi clinici su pazienti affetti da malattie perimplantari.

## Bibliografia

1. Arcelli D., Palmieri A. et al, *Genetic effects of a titanium surface on osteoblasts: a meta-analysis*, *J Oral Sci*, 2007, **49** (4): 299-309
2. Atieh M.A. et al, *Airflow for initial nonsurgical treatment of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis*, *Clin Implant Dent Relat Res*, 2022, **4** (2) p.196-210
3. Baima G., Citterio F. et al, *Surface decontamination protocols for surgical treatment of peri-implantitis: a systematic review with meta-analysis*, *Clin Oral Implants Res*, 2022
4. Barberi J., Spriano S., *Titanium and protein adsorption: an overview of mechanisms and effects of surface features*, *Materials (Basel)* 2021, **14** (7): 1590
5. Berglundh T. et al, *Histopathological observations of human periimplantitis lesions*, *JClin Periodontol.*, 2004, **31** (5), p 341-347
6. Berglundh T., Armitage G et al, *Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*, *JClin Periodontol.*, 2018, **89** (S1) p.S313-S318
7. Brunette DM et al, *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*, Berlin, Springer, 2001
8. Burduşel A. C., et al. *Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview*, *Nanomaterials (Basel)*, 2018, **8** (9): 681
9. Catalani S, Stea S et al, *Vanadium release in whole blood, serum and urine of patients implanted with a titanium alloy hip prosthesis*, *Clin Toxicol (Phila)*, 2013, **51** (7): 550-6
10. Chiapasco M. et al, *Manuale illustrato di chirurgia orale*, quarta edizione, Milano, Edra, 2021
11. Cochran DL, *A comparison of endosseous dental implant surfaces*, *J Periodontol*, 1999, **70** (12): 1523-39
12. Cordeiro JM et al, *Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants*, *Dental Materials*, 2017, **33**: 1244- 1257

13. Cordeiro JM et al, *Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants?*, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, **71**: 1201-1215
14. Devides S.L. et al, *Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported prostheses submitted to immediate load*, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2006, **21** (2) p.262-269
15. Dioguardi M., Cantore S. et al, *Correlation between diabetes mellitus and peri-implantitis: a systematic review*, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2022
16. Dohan Ehrenfest D.M et al, *Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography*, *Trends in Biotechnology*, **28** (4): 198-206
17. Domínguez A.V., et al. *Antibacterial activity of colloidal silver against Gram-negative and Gram-positive bacteria*, *Antibiotics*, 2020, **9** (1): 36
18. Donachie MJ, *Titanium: a technical guide*, seconda edizione, ASM International, 2000
19. Dreyer H., Grischke J. et al, *Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: a systematic review*, *J Periodontal Res.*, 2018, **53** (5) p.657-681
20. Durán N, et al., *Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanism of action*, *J Braz Chem Soc*, 2010, **21** (6) p. 949-959
21. Durán N. et al, *Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity*, *Nanomedicine*, 2016, **12** (3) p. 789-799
22. Ehrenfest DVD, Coelho PG et al, *Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography*, *Trends Biotechnol*, 2010, **282** (4): 198-206
23. Esposito M. et al, *Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review*, *Eur J Oral Implantol.*, 2012, **5** Suppl: S21-41
24. Faramarzi M. et al, *Microbiological and clinical effects of enamel matrix derivative and sustained-release micro-spherical minocycline application as an adjunct to non-surgical therapy in peri-implant mucosal inflammation*, *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 2015, **41** (4) p.181-9
25. Francis S., Iaculli F. et al, *Titanium surface decontamination: a systematic review of in vitro comparative studies*, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2022, **37** (1) p.76-84
26. G. Araujo M., Linfhe J., *Peri-implant health*, *JClin Periodontol.*, 2018, **45** (S20) p.S230-S236

27. G. Caton J, Armitage G., Berglundh et al., *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions- introduction and key changes from the 1999 classification*, *JClin Periodontol.* 2018, **45** (20): S1-S8
28. Giannelli M., *Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation*, *Toxicol in vitro*, 2008, **22** p: 308-317
29. Gonzáles F.J, Requena E. et al, *Adjuvant effect of titanium brushes in peri-implant surgical treatment: a systematic review*, *Dent J (Basel)*, 2021, **9** (8): 84
30. Hamidi M., Harun W. et al, *A review of biocompatible metal injection moulding process parameters for biomedical applications*, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 2017, **78**: 1263-1276
31. Ha Saleh M., Galli M. et al, *The prosthetic-biologic connection and its influence on peri-implant health: an overview of the current evidence*, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2022, **37** (4) p.690-699
32. Hatipoglu M.K., et al, *Source of cytotoxicity in a colloidal silver nanoparticle suspension*, *Nanotechnology*, 2015, **26** (19)
33. Heitz-Mayfield L.J.A, *Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators*, *JClin Periodontol.*, 2008, **35** (S8) p.292-304
34. Heitz-Mayfield L.J.A., E. Salvi G., *Peri-implant mucositis*, *JClin Periodontol.* 2018, **45** (20): S237-S245
35. Heitz-Mayfield L.J.A, Salvi G.E, Mombelli A. et al, *Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study*, *Clinical Oral Implants Research*, 2011, **23** p.205-210
36. Hentenaar D.F. et al, *Implant decontamination with phosphoric acid during surgical peri-implantitis treatment: a RCT*, *Int J Implant Dent*, 2017, **3** (1):33
37. Hultin M, Gustafsson A. et al, *Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis*, *Clin Oral Implants Res.*, 2002, **13** (4) p.349-358
38. Isehede C. et al, *Effectiveness of enamel matrix derivative on the clinical and microbiological outcomes following surgical regenerative treatment of peri-implantitis. A randomized controlled trial*, *J Clin Periodontol*, 2016, **43** (10) p.863-873
39. Isehede C. et al, *Surgical treatment of peri-implantitis using enamel matrix derivative, an RCT: 3-and 5-year follow-up*, *J Clin Periodontol*, 2018, **45** (6) p. 744-753

40. Ivanoff CJ, Hallgren C et al, *Histological evaluation of the bone integration of TiO<sub>2</sub> blasted and turned titanium microimplants in humans*, *Clin Oral Implants Res*, 2001, **12** (2): 128-134
41. Joshi A.A, *Overview of systematic review and meta-analysis investigating the efficacy of different nonsurgical therapies for the treatment of peri-implant diseases*, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2022, **37** (1):e13-e27
42. Johansson CB, Han CH et al, *A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone*, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1998, **13** (3)
43. Khan A. et al, *Management of peri-implantitis lesions without the use of systemic antibiotics: a systematic review*, *Dent J (Basel)*, 2020, **8** (3): 106
44. Kim KT, *General review of titanium toxicity*, *Int J Implant Dent*, 2019, **5**: 10
45. Klinge B. et al, *Peri-implant tissue destruction. The third EAO Consensus Conference 2012*, *Clinical Oral Implants Research*, 2012, **23** (s6) p.108-110
46. Koka S. et al, *Microbial colonization of dental implants in partially edentulous subjects*, *J Prost Dent*, 1993,**70** (2) p 141-144
47. Kotsakis G.A et al, *Systematic review and meta-analysis of the effect of various laser wavelengths in the treatment of peri-implantitis*, *J Periodontol*, 2014, **85** (9) p.1203-1213
48. Kotsakis G.A., Lan C. et al, *Antimicrobial agents used in the treatment of peri-implantitis alter the physicochemistry and cytocompatibility of titanium surfaces*, *J Periodontol*, 2016, **87** p. 809-819
49. Kunrath M, *Innovative surfaces and alloys for dental implants: what about biointerface-safety concerns?*, *Dent Mater*, 2021, **37** (10): 1447-1462
50. Lang N.P, Lindhe J., *Clinical Periodontology and implant dentistry*, sesta edizione, Milano, Edi.Ermes, 2020
51. Lee J.C-Y. Et al, *Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis*, *Clin Oral Implants Res*, 2012, **23** (3) p. 325-333
52. Le Guéhennec L., Soueidan A et al, *Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*, *Dent Mater*, 2007, **22** (7): 884-854
53. Leonhardt A et al, *Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man*, *J Periodontol*, 2003, **74** (10) p. 1415-1422



54. Li Q, Mahendra S et al, *Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications*, *Water Res.*, 2008, **42** (18) p. 4591-4602
55. Li Z., Li K. et al, *The effect of nonaugmentative approaches in the surgical treatment of peri-implantitis: a systematic review and network meta-analysis*, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2022, **373** (2) p.270-282
56. Máximo M.B., *Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies*, *Clin Oral Implants res.*, 2009, **20** (1) p. 99-108
57. Mellado-Valero A. et al, *Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review*, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2013, **18** (6) p.e869-e876
58. Mensi M. et al, *A new multiple anti-infective non-surgical therapy in the treatment of peri-implantitis: a case series*, *Minerva Stomatol*, 2017, **66** (6) p.255-266
59. Mensi M. et al, *Comparison between four different implant surface debridement methods: an in-vitro experimental study*, *Minerva Stomatol.*, 2020, **69** (5) p.286-294
60. Moharrami M., Perrotti V. et al, *Effects of air abrasive decontamination on titanium surfaces: a systematic review of in vitro studies*, *Clin Implant Dent Relat Res*, 2019, **21** (2) p. 398-421
61. Mombelli A. et al, *Antimicrobial advances in treating periodontal diseases*, *Frontiers of oral biology*, 2012, **15** p.133-148
62. Mombelli A. et al, *The epidemiology of peri-implantitis*, *Clin Oral Implants Res*, 2012, **23** (s6) p. 67-76
63. Muthukuru M., Zainvi A et al, *Non-surgical therapy for the management of peri-implantitis: a systematic review*, *Clin Oral Implants Res*, 2012, **23** (s6) p.77-83
64. Ntrouka V. I. et al, *The effect of chemotherapeutic agents on contaminated titanium surfaces: a systematic review*, *Clin Oral Implants Res*, 2010, **22** p. 681-690
65. Palmquist A, Lindeberg F et al, *Morphological studies on machined implants of commercially pure titanium and titanium alloy (Ti6Al4V) in the rabbit*, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009, **91b** (1): 309-319
66. Palmquist A, Omar OM, Esposito M et al, *Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome*, *JR Soc Interface*, 2010, **7** (Suppl 5): S515-27

67. Pandey C et al, *Contemporary concepts in osseointegration of dental implants: a review*, *Biomed Res Int*, 2022
68. Passeri G, Cacchioli A et al, *Adhesion pattern and growth of primary human osteoblastic cells on five commercially available titanium surfaces*, *Clin Oral Implants Res*, 2010, **21** (7): 756-765
69. Passi P et al, *PIXE micro-beam mapping of metals in human peri-implant tissues*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2002, **13**: 1083-1089
70. Pérez-Tanoira R. et al, *Silver nanoparticles produced by laser ablation and re-irradiation are effective preventing per-implantitis multispecies biofilm formation*, *Int J Mol Sci.*, 2022, **23** (19)
71. Persson G. R., Samuelsson E. et al, *Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a single-blinded randomized longitudinal clinical study.II. Microbiological results*, *J Clin Periodontol*, 2010, **37** (6) p. 563-573
72. Pimenta J et al, *Physical characterization of 3 implant systems made of distinct materials with distinct surfaces*, *J Prosthet Dent*, 2022, **128** (1): 63-72
73. Ramanauskaite A et al, *Efficacy of alternative or adjunctive measures to conventional non-surgical and surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis*, *Int J Implant Dent*, 2021, **7** (1): 112
74. Ramanauskaite A., Schwarz F., Sader R., *Influence of width of keratinized tissue on the prevalence of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis*, *Clin Oral Implants Res*, 2022, **33** Suppl23 p.8-31
75. Ramanauskaite A. et al, *Treatment of peri-implantitis: meta-analysis of findings in a systematic literature review and novel protocol proposal*, *Quintessence Int*, 2016, **47** (5) p. 379-393
76. Rasmusson L et al, *A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants*, *Clin Implant Dent Relat Res*, 2005, **7** (1): 36-42
77. Ravida A., Arena C. et al, *The role of keratinized mucosa width as a risk factor for peri-implant disease: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis*, *Clin Implant Dent Relat Res*, 2022, **24** (3) p. 287-300
78. Reidy B, Haase A et al, *Mechanism of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications*, *Materials*, 2013, **6** p. 2295-2350

79. Renvert S. et al, *Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review*, *J Clin Periodontol*, 2008, **35** (Suppl.8) p. 305-315
80. Renvert S. et al, *Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: case definitions and diagnostic considerations*, *J Clin Periodontol*, 2017, **45** (S20) p. 278-285
81. Renvert S. et al, *Surgical therapy for the control of peri-implantitis*, *Clinical Oral Implants Research*, 2012, **23** (s6) p. 84-94
82. Renvert S. et al, *Treatment modalities for peri-implant mucositis and peri-implantitis*, *Am J Dent.*, 2013, **26** (6) p. 313-318
83. Rocuzzo M, Layton D.M et al, *Clinical Outcomes of peri-implantitis treatment and supportive care: a systematic review*, *Clinical Oral Implants Research*, 2018, **29** (s16) p.331-350
84. Rocuzzo M., De Angelis N. et al, *Ten-year results of a three-arm prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 1: implant loss and radiographic bone loss*, *Clin Oral Implants Res.*, 2010, **21** (5) p.490-496
85. Schimmei M. et al, *Effect of advanced age and/or systemic medical conditions on dental implant survival: a systematic review and meta-analysis*, *Clin Oral Implants Res.*, 2018, **29** (Suppl 16) p. 311-330
86. Schwarz F., *Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants*, *Clin Oral investing.*, 2005, **9** (2) p. 111-117
87. Schwarz F. et al, *Peri-implantitis*, *J Clin Periodontol*. 2018, **45** (20): S246-S266
88. Sculean A. et al, *Five- year clinical and histological results following treatment of human intrabony defects with an enamel matrix derivative combined with a natural bone mineral*, *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2008, **228** (2) p. 153-161
89. Shah FA, Trobos M et al, *Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants- Is one truly better than the other?*, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, **62**: 960-6
90. Shang R., Gao L., *Impact of hyperglycemia on the rate of implant failure and peri-implant parameters in patients with type 2 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis*, *J Am Dent Assoc*, 2021, **152** (3) p. 189-201
91. Shibli J.A., *Composition of supra-and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants*, *Clin Oral Implants res*, 2008, **19** (10) p.957-982

92. Socransky SS et al, *Microbial complexes in subgingival plaque*, *Jclin Periodontol.*,1998, **25** (2) p.134-144
93. Spoto G. et al, *Materiali e tecnologie odontostomatologiche*, terza edizione, Milano, Ariesdue Srl, 2019
94. Staubli N. et al, *Excess cement and the risk od peri-implant disease- a systematic review*, *Clin Oral Implants Res*, 2016, **28** (10) p. 1278-1290
95. Stenport VF, Johannsson CB, *Evaluations of bone tissue integration to pure and alloyed titanium implants*, *Clin Implant Dent Realt Res*, 2008, **10** (3): 191-9
96. Tardelli JDC et al, *Comparative analysis of corrosion resistance between beta titanium and Ti-6Al- 4V alloys: a systematic review*, *J Trace Elem Med Biol*, 2020, **62**: 126618
97. Tardelli JDC et al, *Influence of chemical composition on cell viability on titanium surfaces: a systematic review*, *J Prosthet Dent*, 2021, **125** (3): 421-225
98. Ting M., *Laser treatment of peri-implantitis: a systematic review of radiographic outcomes*, *Dent J (Basilea)*, 2022 **10** (2):20
99. Toledano M., Osorio M.T. et al, *Efficacy of local antibiotics therapy in the treatment of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis*, *J Dent*, 2021, **113**
100. Tran P.L., et al. *The ability of colloidal silver gel wound dressing to kill bacteria in vitro and in vivo*, *J Wound Care*, 2017, **26** (Sup4):S16-S24
101. Tran P.L., et al. *Efficacy of a silver colloidal gel against selected oral bacteria in vitro*, *F1000Res*, 2019, **8**
102. Trulsson M., *Sensory-motor function of periodontal mechanoreceptors*, *J Oral Rehabil*, 2006, **33** (4) p. 262-273
103. Ungvári K et al, *Effects on titanium implant surfaces of chemical agents used for the treatment of peri-implantitis*, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2010, **94B** p.222-229
104. Vishwanath N., Whitaker C. et al, *Silver as an antibiotic-independent antimicrobial: review of current formulations and clinical relevance*, *Surg Infect (Larchmt)*, 2022, **23** (9): 769-780
105. Wang Y. et al, *Efficacy of antibiotics used as an adjunct in the treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis*, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2022, **37** (2) p.235-249
106. Willis J, Li S et al, *Is titanium alloy Ti-6Al-4V cytotoxic to gingival fibroblasts- A systematic review*, *clin Exp Dent Res*, 2021, **7** (6): 1037-44

107. Yin I.X., et al. *The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry*, *Int J Nanomedicine*, 2020, **15** p. 2555-2562
108. Zhang LC, Chen LY, *a review on biomedical titanium alloys: recent progress and prospect*, *Adv Eng Mater*, 2019, **21**
109. Zhao T. et al, *The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of peri-implantitis*, *Comput Math Methods Med*, 2022
110. Zhao Y. et al, *Antimicrobial photodynamic therapy versus antibiotics as an adjunct in the treatment of periodontitis and peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis*, *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 2021, **34**