



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Corso di Laurea in Odontoiatria e protesi dentaria
Presidente: Prof. Maurizio Procaccini

Tesi di Laurea:

**Demineralizzazione e remineralizzazione
dentale: due facce della stessa medaglia**

Relatore: Chiar.mo

Prof. Francesco Sampalmieri

Candidato:

Beatrice Perugini

Anno Accademico 2021 - 2022

INDICE

CAPITOLO I: DENTE e PROCESSO DI MINERALIZZAZIONE	4
1. LA STRUTTURA DEL DENTE	5
1.1. Lo smalto dentale	6
1.2. Idrossiapatite	7
2. ODONTOGENESI	11
2.1. Processo di mineralizzazione.....	12
2.1.1. Amelogenesi.....	12
CAPITOLO II: LA DEMINERALIZZAZIONE	15
1. DEFINIZIONE	16
2. IL QUADRO EPIDEMIOLOGICO IN ITALIA	16
3. EZIOLOGIA e FATTORI DI RISCHIO	18
3.1. Il ruolo della saliva	19
3.2. Formazione del Biofilm da parte dei germi patogeni	21
4. PATOGENESI	28
4.1. Meccanismo d'azione degli acidi e degli agenti alchilanti	29
4.1.1. Via intrinseca: fermentazione lattica batterica	31
4.1.2. Acido Citrico	33
4.1.3. Acido Carbonico	36
4.1.4. Acido Fosforico	36
5. CLINICA	38
5.1. Lesione erosiva	38
5.1.1. Documentazione fotografica di varie lesioni erosive	40
5.2. White spots.....	43
5.3. Sensibilità dentinale	44
5.4. Conseguenze cliniche legate alla demineralizzazione	44
6. DIAGNOSI	45
6.1 Scale di valutazione ed indici clinici	45
6.2 Analisi Strumentale.....	48
CAPITOLO III: LA REMINERALIZZAZIONE	54
1 DEFINIZIONE	55
2 LINEE GUIDA GENERALI	56
3 AGENTI REMINERALIZZANTI	57
3.1 Fluoro	58
3.2 Calcio e fosfato.....	64
3.2.1 Calcio fosfato amorfo – ACP	65
3.3 Idrossiapatiti	69
3.3.1 Chitosano	71
3.4 Biovetri	72
3.5 Silicati di calcio	74
3.6 Peptidi autoassemblanti p11-4	75
3.7 Arginina	76
3.8 Xilitolo	77
CAPITOLO IV: CONCLUSIONI	79
CONCLUSIONI	80
BIBLIOGRAFIA	83

INTRODUZIONE

Questa tesi prenderà in considerazione i vari aspetti della demineralizzazione dentale, trattandone nello specifico i processi chimici e clinici che porteranno alla creazione di tale processo nel cavo orale ed esaminandone tutte le possibili cause sia legate ad uno stile di vita non del tutto appropriato ed in linea con le direttive cliniche odontoiatriche, sia legate ad aspetti patologici e/o genetici che la inducono.

Chiarito il concetto demineralizzativo ed appurati i suoi meccanismi si andrà nello specifico poi a focalizzare l'attenzione anche sull'aspetto remineralizzativo, fondamentale per la ricostruzione dello smalto danneggiato dalla sopracitata demineralizzazione.

Sono molte le tecniche ed i materiali utilizzati nella remineralizzazione e riparazione dei danni dello smalto e che si sono susseguiti negli anni, i quali hanno spianato sempre più la strada ad un'ampia rosa di varianti cliniche con le quali risolvere il problema. Si spazia infatti da gel a base di fluoro e biosmalti, a paste allo xilitolo per arrivare infine alla più moderna tecnica clinica di gel contenente lattocaseina e derivati ad essa associati.

Ognuno dei metodi clinici utilizzati ci permette ad oggi di raggiungere ottimi risultati per contrastare il processo demineralizzativo dei denti ed i danni ad esso collegati, ed in questa tesi andremo ad evidenziare i pro ed i contro di ognuno di loro, in modo da avere un quadro esatto su quale sia la strategia clinica migliore da utilizzare in base al tipo di caso che ci verrà sottoposto. Prima di approcciarci e spiegare nei dettagli i processi di demineralizzazione e remineralizzazione, è bene partire e tener presente l'analisi di tutti tessuti duri che compongono ogni singolo elemento dentale: approfondimento che ci sarà poi fondamentale per approcciarci alla cura del paziente.

***CAPITOLO I:
DENTE e PROCESSO DI MINERALIZZAZIONE***

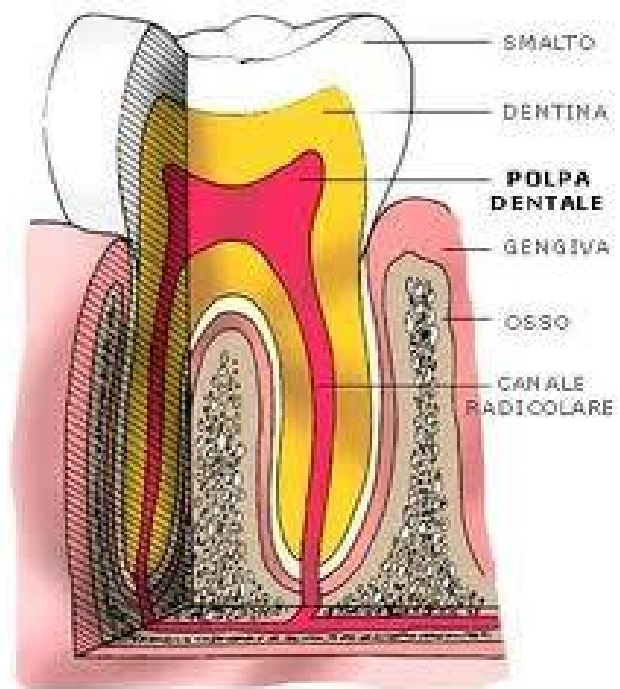
1. LA STRUTTURA DEL DENTE

-Smalto: lo smalto è il tessuto superficiale che riveste la parte visibile del dente definita corona del dente ed è altamente mineralizzato: esso rappresenta infatti il tessuto più duro e resistente del corpo umano, ed è costituito da un cristallo di calcio e fosfato che si chiama idrossiapatite. E' responsabile della brillantezza e lucentezza del dente.

-Dentina: la dentina è la struttura che maggiormente compone il dente, circonda la polpa sia nella corona che nella radice. È anch'essa costituita da idrossiapatite ma è meno mineralizzata rispetto allo smalto e pertanto un po' meno resistente. e' percorsa da numerosi piccoli canali, definiti tubuli, che dalla polpa dentaria raggiungono la parte più superficiale della dentina.

per questo, se la dentina non è ricoperta da smalto ed è esposta a stimoli esterni, può portare a fenomeni di ipersensibilità dentinale.

-Cemento: il cemento invece riveste la dentina a livello radicolare e garantisce l'ancoraggio delle fibre del legamento parodontale alla superficie radicolare. E' molto mineralizzato ma è rappresentato da uno strato molto sottile: se si espone al cavo orale, come nel caso della parodontite o delle recessioni gengivali, si abrade velocemente e scompare.



1.1. Lo smalto dentale

Lo smalto è la sostanza più dura del corpo umano, più dura persino dell'osso e della cartilagine, e per questa sua caratteristica è ideale per le funzioni fisiologiche di mordere, masticare e proteggere la polpa interna, dove risiedono i nervi. Esso riveste infatti la zona più superficiale ed esposta all'ambiente orale come un cappuccio, raggiungendo il massimo spessore nella superficie masticatoria-occlusale ed assottigliandosi in prossimità del colletto, dove viene a sua volta rivestito dal cemento, tessuto del parodonto che si trova esclusivamente nelle radici degli elementi dentali e partecipa alla funzione di sostenere il dente nel suo alveolo.

E' altamente mineralizzato e costituito per il 4-5% del suo peso da acqua e componenti organiche (principalmente proteine e lipidi), mentre la parte restante è rappresentata da sostanze inorganiche, prima tra tutte l'idrossiapatite che occupa il 96% della sua composizione.

Lo smalto è anche un tessuto avascolare che non presenta quindi né cellule né vasi sanguigni al suo interno.

La maggior parte delle sue proprietà meccaniche sono attribuite alla sua microstruttura interna; è infatti costituito da prismi ricchi di minerali incorporati in una matrice formata da acqua, materiale organico e materiale non prismatico. I singoli prismi sono fasci di cristalli di idrossiapatite di calcio (HA) e misurano 3-6 μm di diametro. Il loro orientamento varia in base alla localizzazione; infatti in prossimità della superficie occlusale, sono generalmente perpendicolari alla superficie e disposti in modo ordinato, mentre in prossimità della giunzione smalto dentinale (DEJ), sono orientati in modo casuale senza alcun allineamento fisso rispetto alla superficie occlusale.

1.2. Idrossiapatite

La comprensione della struttura chimica e delle proprietà dell'idrossiapatite, d'ora in poi scritta come HA, è fondamentale per poter poi capire il processo demineralizzante che ne inficia la solubilità.

L' HA è un minerale organico, principale costituente delle ossa umane e dei denti (presente nello smalto e nella dentina), la cui formula nella sua versione pura è:



comunemente scritta moltiplicando i pedici per 2 per evidenziare che la cella elementare, della forma reticolare cristallina, è costituita da 2 unità:



I cristalli di idrossiapatite hanno la forma di un prisma molto sottile, dalla forma esagonale (figura 2), il cui asse c, quello verticale, è solitamente occupato dal gruppo ossidrile (OH) mentre parallelamente all'asse a, quello orizzontale, ritroviamo parte del gruppo fosfato (figura 3-4), avente forma tetraedrica (figura 5).

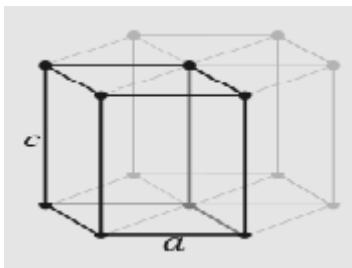


Figura 2: Figura prismatica esagonale, visibile in grigio chiaro, con evidenza di una delle 6 celle elementari cuboidi e gli assi a e c

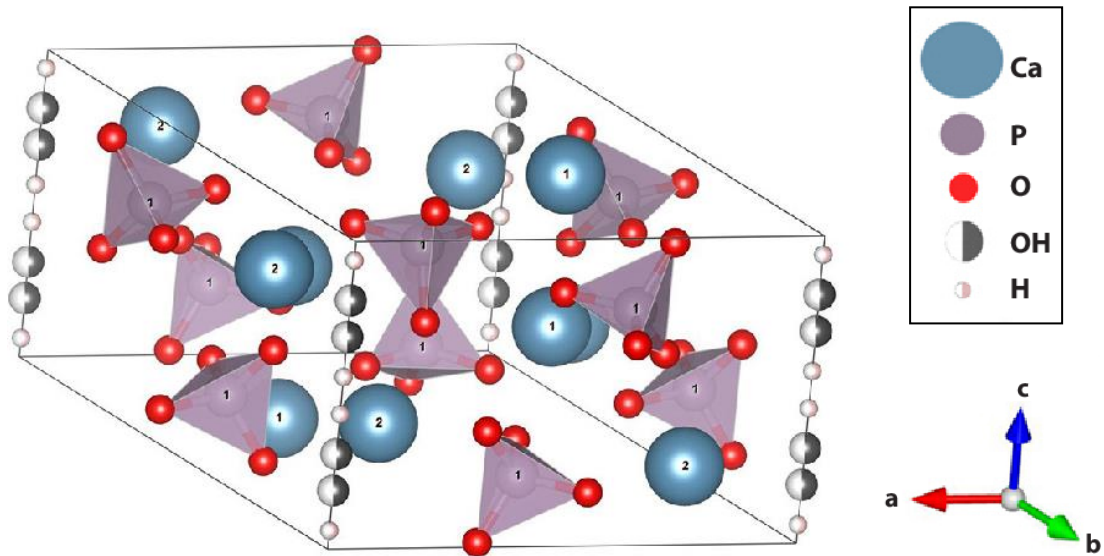


Figura 3: Struttura della cella elementare dell'idrossiapatite, con ben evidenziati i gruppi ossidrilici nell'asse "c" e il gruppo fosfato negli assi paralleli all'asse orizzontale "a".

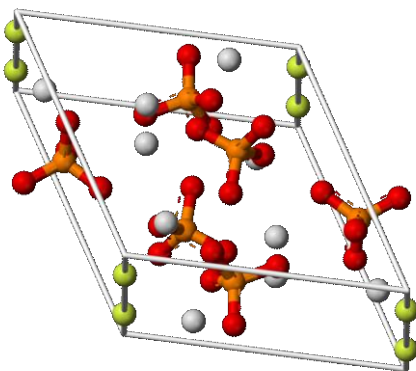
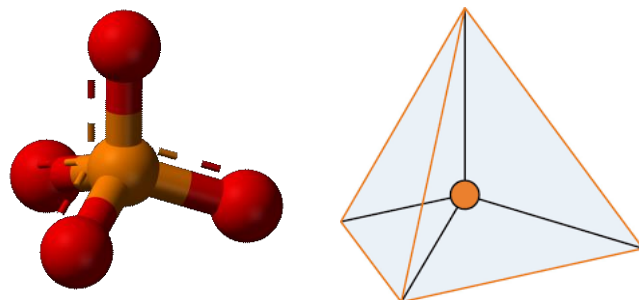


Figura 4: Ulteriore ricostruzione 3D della cella elementare dell'HA. (In verde i gruppi ossidrilici, in arancione il P, in rosso l'O ed i bianco il Ca)

Fig 5: A lato, riconsruzione 3D del gruppo fosfato (PO_4) con forma tetraedrica



La composizione delle ossa umane è differente da quella del dente poiché, principalmente, nelle ossa umane ritroviamo i cristalli di HA miscelati con una componente organica formata per il 90% da collagene di tipo I; mentre nel dente, essi sono interposti ad una struttura organica principalmente formata da proteine come Amelogenine e Smaltine e da una matrice extracellulare composta da metalloproteasi di tipo 20.

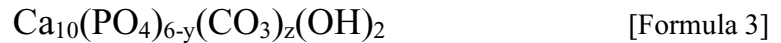
Relativamente invece alla componente inorganica, il 90% dello smalto è composto da cristalli di HA, mentre nelle ossa, ma anche nella dentina e nel cemento, questa percentuale è minore; inoltre anche i cristalli stessi di HA hanno dimensioni differenti: nello smalto dentale essi sono più spessi (25 nm vs 1,5nm), più larghi (40-120 nm vs 20nm), più lunghi (160-1000nm vs 40-60nm) e più regolarmente ordinati al fine di garantire una maggior resistenza e copertura di tutti i pori presenti sulla superficie dentale.

L'HA nei tessuti biologici, tuttavia, non è quasi mai presente nella sua forma in purezza, come riportato nella formula 2, poiché molto spesso si compiono spontaneamente degli episodi di sostituzione ionica; per esempio:

- Il catione Ca^{2+} può essere sostituito, in circa l'1% dei casi, con Mg^{2+} , K^+ o Na^+ (quest'ultimo più frequentemente);
- Il sito idrossile OH^- può essere sostituito con atomi F^- o Cl^-
- Il sito PO_4^{3-} può essere sostituito dall'anione carbonato CO_3^{2-}

Tutte queste possibili sostituzioni modificano, in maniera importante, le caratteristiche fisiche e chimiche dell'HA comportando per esempio un aumento di solubilità in ambiente acido, se si ha una carbonato-idrossiapatite, o una riduzione della solubilità, se si ha una fluorapatite.

Nella carbonato-idrossiapatite alcuni gruppi PO_4^{3-} sono sostituzione con CO_3^{2-} secondo la formula:



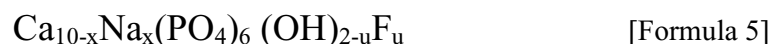
*Il CO_3 non sostituisce PO_4 con un rapporto stechiometrico di 1:1; per cui la formula viene espressa con un'incognita y e una z, entrambe con valore ≥ 1 , ma non obbligatoriamente uguale.

Fisiologicamente almeno il 3% dell'HA che compone lo smalto dentale, e circa il 6% di quella dentinale, sono in realtà carbonate; questa percentuale aumenta con l'aumentare dell'età.

Nella fluorapatite si ha invece la sostituzione di OH^- con F^- , ottenendo:



Tutte queste sostituzioni si verificano in maniera più o meno frequente, di conseguenza la maggior parte dell'HA che compone lo smalto dentale, e di conseguenza anche la dentina, non è pura, ma viene definita "idrossiapatite carente di calcio" con formula:



La **formula finale dell'HA dentale**, considerando anche l'esistenza della carbonatoidrossiapatite, risulta quindi essere:



2. ODONTOGENESI

Il processo di mineralizzazione dentale fa parte dell'enorme processo di formazione e maturazione dei denti che viene definito odontogenesi, del quale successivamente verranno accennate solo le tappe più importanti al fine di comprenderne le varie fasi.

A partire dallo stomodeo si andranno a formare le due lamine dentali primarie, una per l'arcata superiore ed una per quella inferiore, che assumeranno varie forme: a gemma, a clava e poi a cappuccio (definito stadio a campana). Al centro della concavità della campana si andranno a depositare cellule di origine mesodermica che formeranno poi la papilla dentale e che quindi daranno origine agli odontoblasti, cellule capaci di produrre predentina, sostanza simile alla dentina ma che non è mineralizzata. Nello strato più esterno della campana invece, tramite un'introflessione dell'epitelio, si ritroveranno i tessuti di origine ectodermica che formeranno poi lo smalto, tramite la differenziazione in ameloblasti ed un successivo processo di mineralizzazione. Il processo di demineralizzazione comprende anche la deposizione di cristalli di HA nella predentina comportando così la formazione della dentina.

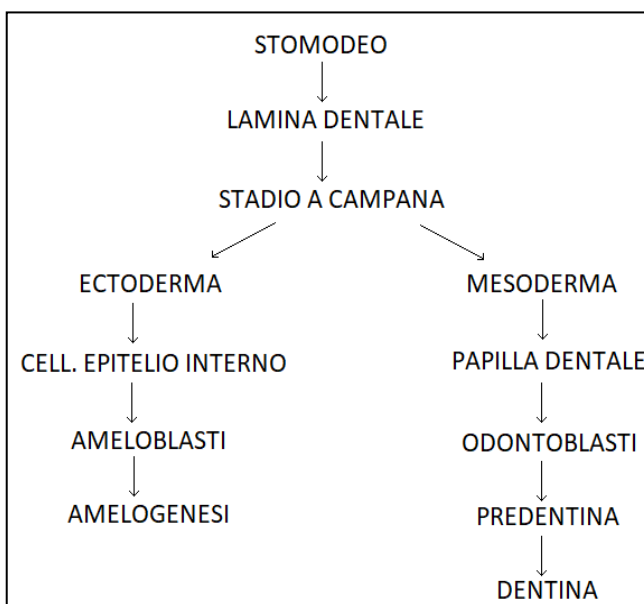


Fig.6: Schema riassuntivo dell'odontogenesi

2.1. Processo di mineralizzazione

La mineralizzazione è un processo permanente, in cui una sostanza inorganica precipita su una matrice organica. In questo paragrafo non affronterò il tema della mineralizzazione della dentina, che partendo da un'impacatura di fibre collagene inizierà a depositare cristalli di HA e mineralizzerà così la predentina, ma mi soffermerò a parlare del processo di amelogenesi, utilissimo per comprendere poi il sottostante processo patologico di demineralizzazione dello smalto, di cui tratta questa tesi.

2.1.1. Amelogenesi

Lo smalto inizia il processo di mineralizzazione subito dopo che la dentina della giunzione tra smalto e dentina inizia il suo processo di mineralizzazione; infatti le cellule dell'ameloblasto, grazie al processo di Tomes, secernono una sostanza amorfa ricca di amelogenine, ameloblastine e metalloproteasi, sulla superficie esterna della papilla dentale comportando, immediatamente, la mineralizzazione di circa il 30% della superficie smaltale tramite l'enzima fosfatasi alcalina. Questa matrice amorfa secreta dagli ameloblasti sarà intervallata dalla dentina prodotta dai sottostanti odontoblasti che verrà poi mineralizzata. Infatti, il processo di amelogenesi si divide in 2 fasi: la prima è quella precedentemente spiegata ed è definita fase "secretoria"; la seconda invece è una fase di transizione/maturazione e riassorbimento. In questa seconda fase, infatti, gli ameloblasti inizieranno a subire modificazioni morfofunzionali; (Fig.9) ad esempio diventeranno cellule striate con bordi non omogenei, e non secerneranno più proteine ma riassorbiranno amelogenine, ameloblastine, smaltine e tifteline al fine di poter poi depositare Ca^{2+} nella matrice, tramite un processo di trasporto at-

tivo e passivo. Si inizieranno così a formare i primi cristalli di HA che inizieranno a mineralizzare ed ad allungarsi fino a formare pacchetti di filamenti lunghi e sottili, caratterizzati da circa 10.000-40.000 “nastri”. A questo punto gli ameloblasti continueranno a riassorbire proteine fino a che la superficie totale dello smalto non diventi, per il 96%, composta da materiale inorganico mineralizzato.

Alcuni studi in letteratura, invece, dividono il processo di amelogenesi in 4 fasi considerando, oltre alla fase di secrezione una precedente fase di presecrezione (caratterizzata dalle prime secrezioni di denteina da parte degli odontoblasti) ed una fase di transizione tra la seconda fase di secrezione e l'ultima di maturazione; tuttavia, in entrambi i casi, che sia divisa in 2 fasi o 4, il processo avviene nella stessa maniera.

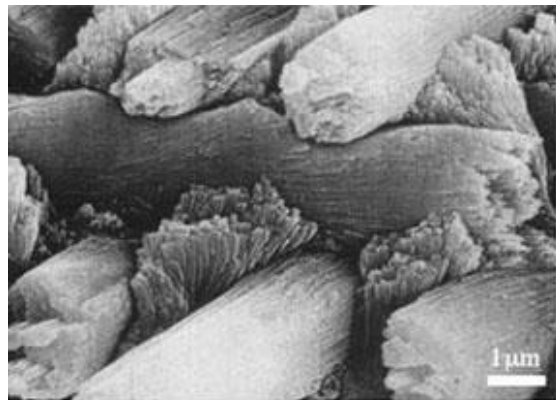


Fig.7: Filmaneti di HA al SEM (microscopio elettronico a scansione)

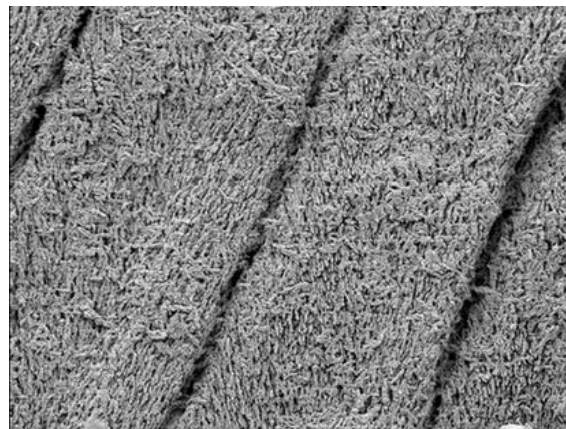


Fig.8: Immagine al SEM dello smalto fisiologico

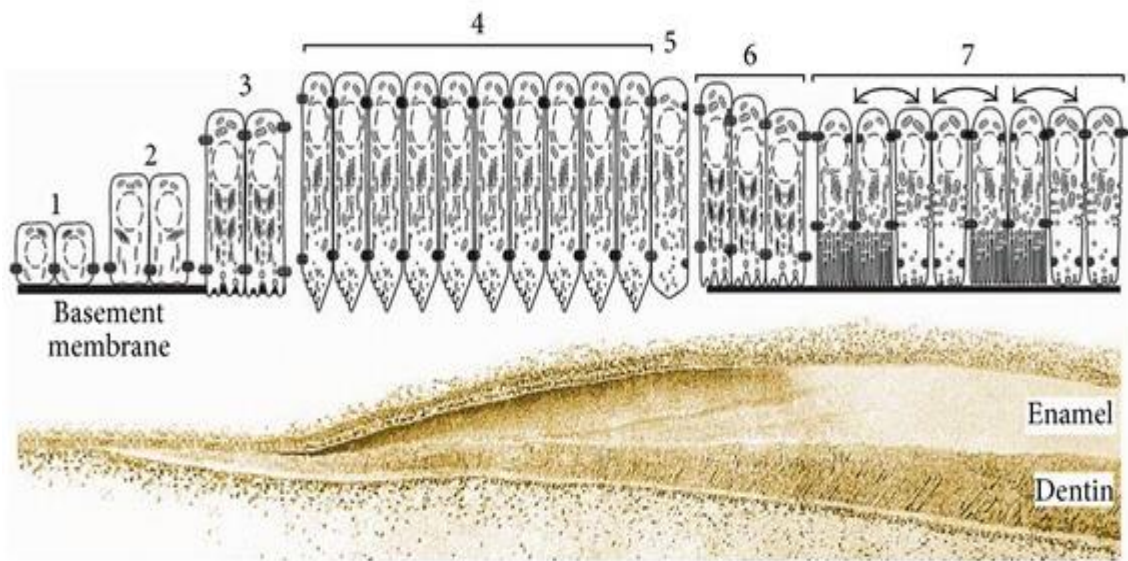


Fig.9: Schema riassuntivo dei cambiamenti degli ameloblasti durante il processo di amelogenesi dentale.

1. Le cellule epiteliali dell'epitelio interno dello smalto poggiano su una membrana basale contenente laminina.
2. Queste cellule aumentano di lunghezza e diventano ameloblasti differenziati al di sopra della matrice predentina.
3. Gli ameloblasti presecretori, inviando processi attraverso la membrana basale in degenerazione, avviano la secrezione di proteine dello smalto sulla superficie dei villi della dentina mineralizzante.
4. Dopo aver stabilito la giunzione smalto-dentina e aver mineralizzato un sottile strato di smalto aprismatico, gli ameloblasti sviluppano una specializzazione secretoria definita "processo di Tomes". Lungo la faccia secretoria del processo di Tomes, al posto della membrana basale assente, gli ameloblasti secretori secernono proteine col fine di far crescere in lunghezza i cristalli di smalto.
5. Al termine della fase secretoria, gli ameloblasti perdono il processo di Tomes.
6. Lo smalto avendo raggiunto lo spessore finale induce un'importante ristrutturazione degli ameloblasti comportando una diminuzione dell'attività secretoria.
7. Durante la fase di maturazione gli ameloblasti modulano tra fasi arruffate e lisce e secernono KLK4 (Kallikrein related peptidase 4) che degrada la matrice proteica accumulata.

***CAPITOLO II:
LA DEMINERALIZZAZIONE***

1. DEFINIZIONE

Il fenomeno della demineralizzazione dentale consiste in un processo progressivo di perdita dei minerali che compongono i tessuti duri del dente stesso; in concreto, esso consiste in una rimozione degli ioni minerali dai cristalli di HA dei tessuti duri come smalto, dentina e cemento. Il processo di demineralizzazione è un processo reversibile poichè i cristalli di HA parzialmente demineralizzati possono ritornare nuovamente alla loro dimensione originale tramite trattamento remineralizzativo.

2. IL QUADRO EPIDEMIOLOGICO IN ITALIA

Il processo patologico della demineralizzazione interessa individui di ogni età e la sua prevalenza, sia nella dentatura decidua che in quella permanente, aumenta di pari passo con l'aumentare degli anni.

In Italia il quadro epidemiologico si presenta non omogeneo e con una diffusione irregolare, a macchia di leopardo: infatti i dati più recenti reperibili dalla letteratura riportano che nella regione Veneto nel 2018, su un campione di 560 adolescenti, è emersa una prevalenza della patologia demineralizzativa del 63,4%, mostrando anche un'associazione statisticamente significativa associata ad un basso livello socio-economico. Nello stesso anno, in centro Italia, si è potuta osservare una prevalenza della patologia demineralizzativa del 70,46% su un campione di 231 adolescenti e bambini analizzati.

Sempre nel 2018, a Palermo, si è riscontrata una prevalenza complessiva del 38,5% a 5 anni e del 44,97% a 12 anni: da questo particolare lavoro emerge che il livello educativo dei genitori, i quali controllano e dettano ancora le abitudini dei loro figli, sembra essere un fattore di protezione

contro questa patologia dentale, mentre in quelli di 12 anni il consumo frequente di spuntini ed alimentazioni tendenzialmente scorrette e fuori dal controllo genitoriale, è significativamente associato all'insorgenza di carie e demineralizzazione dello smalto dentale.

Dalle indicazioni rilevabili dalla letteratura nazionale e dai dati ad essa associati, quindi, si può dedurre che attuare le vigenti metodiche di prevenzione sia fondamentale sin da piccoli per prevenire, così come nell'età adulta per contrastare, l'innescarsi dei processi che portano alla demineralizzazione dentale e mantenere nel tempo una corretta salute del cavo orale.

3. EZIOLOGIA e FATTORI DI RISCHIO

Il fenomeno della demineralizzazione è un processo multifattoriale il quale non dipende solo da un elemento patologico ma da diversi elementi, definiti come fattori di rischio.

Essi sono suddivisi in 4 gruppi principali: Biologici, Chimici, Comportamentali e Salute; come mostrato nella tabella sottostante (Tab 1).

BIOLOGICO	CHIMICO	COMPORAMENTO	SALUTE
Flusso salivare	PH orale	Dieta	Status socio-economico
Composizione salivare	Tipo di acido presente nel cavo orale	Igiene orale	Farmaci assunti
Anatomica del dente	Potenziale chelante dell'acido	-	Patologie

Tab.1: Fattori di rischio per il fenomeno demineralizzativo.

Il meccanismo della demineralizzazione, andando ad apportare modifiche in difetto sulla quantità dei minerali che compongono il dente, va a ledere per prima cosa il suo strato più superficiale, cioè quello dello smalto, che a lungo andare perderà progressivamente i cristalli di idrossiapatite, del quale è composto per il 96%. In questo capitolo analizzeremo gli elementi più importanti che possono influenzare l'ambiente orale andando a modificare il Ph.

3.1. Il ruolo della saliva

La saliva in condizioni normali possiede un pH neutro che oscilla tra 6,5 e 7,4, ricoprendo un ruolo fondamentale in tutti i processi fisiologici e/o patologici che avvengono all'interno del cavo orale: essa contiene infatti ioni bicarbonato, sostanza importantissima per il suo ruolo "TAMPONE" che contrasta i metaboliti acidi prodotti dai microrganismi batterici che colonizzano le superfici dentali, mantenendo così il pH del cavo orale alla neutralità, per esempio dopo i pasti (Lussi A. et al., 2009).

Al contrario però, se il valore di pH della saliva non venisse più regolato naturalmente abbassandosi sotto a 5.5, valore soglia di tolleranza dei denti stessi, lo smalto, non essendo in grado di resistere a pH così acidi, inizierebbe a danneggiarsi e gradualmente a demineralizzarsi. Nel momento in cui tale acidità salivare dovesse ulteriormente persistere nel cavo orale, senza essere riportata a valori neutri, l'integrità dello smalto dentale sarebbe ancora più compromessa comportando una demineralizzazione estesa anche al tessuto sottostante: la dentina.

Nel dettaglio il continuo persistere dell'ambiente acido è fonte di alterazione dell'equilibrio chimico degli elettroliti presenti sulle superfici del dente, poiché crea un eccesso di solubilizzazione in forma ionica dei componenti chimici che formano la matrice cristallina del dente, in particolare dell'idrossiapatite.

Le cause che possono influenzare l'azione della saliva sul mantenimento del PH sono molteplici:

- Patologie di ordine medico, come la Sindrome di Sjogren oppure la Sarcoidosi, possono generare una situazione di Xerostomia andando così ad inficiare l'azione tampone della saliva.

- In egual modo l'eventuale pregressa radioterapia, per cause tumorali del distretto testa collo, può comportare un danno irreversibile alle ghiandole salivari mandandole in atrofia o fibrosi.
- L'assunzione di farmaci neurolettici, antidepressivi, antiepilettici o anche alcuni comuni farmaci antipertensivi possono comportare ugualmente una situazione temporanea di xerostomia.
- Il fumo, oltre alle più note cause respiratorie (come BPCO) e protumorali, va ad ostacolare anche la normale salivazione riducendola.

In letteratura sono stati individuati anche altri fattori predisponenti il processo demineralizzativo, poichè comportano un abbassamento del Ph orale:

- Un numero ridotto di probiotici quali Lactobacillus e Bifidobacterium è un possibile fattore scatenante poichè essi possiedono un'azione protettiva verso la formazione del biofilm da parte di germi patogeni. (Paragrafo 3.2)
- L'alimentazione inoltre riversa un ruolo predominante, infatti, assumere enormi quantitativi di frutta o sostanze carbonatate (come bevande gassate e molto zuccherate) promuove il processo demineralizzativo a causa dell'azione chimica indotta dagli acidi stessi contenuti nell'alimento. (Paragrafo 3.3)
- Patologie del disturbo alimentare come la Bulimia o l'Anoressia possono abbassare il Ph salivare, mediante i ripetuti episodi di vomito*. Allo stesso modo la patologia del Reflusso Gastroesofageo (MERG), se non trattata per lungo tempo, può comportare un abbassamento del PH salivare.

*I succhi gastrici, responsabili della digestione, contengono elevate quantità di Acido Cloridrico (HCl), un acido molto forte con $Ph \approx 1$

3.2. Formazione del Biofilm da parte dei germi patogeni

I batteri normalmente residenti nel cavo orale producono, partendo principalmente dai carboidrati assunti con l'alimentazione, una sostanza adesiva, trasparente ed insolubile nell'acqua, con spessore di 0.1-3 μm , detto Biofilm.

Esso permette la colonizzazione dell'ambiente orale da parte dei batteri facendoli aderire alle pareti dei denti e, successivamente, attraendo altri microrganismi in modo da creare colonie di batteri. Quest'ultimi, nutrendosi di zuccheri e producendo scorie acide, gradualmente riusciranno a dissolvere la matrice minerale del dente innescando il processo di demineralizzazione con le sue conseguenti lesioni cavitare.

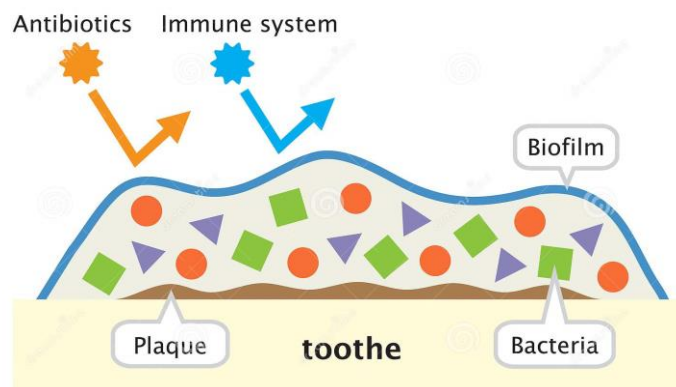


Fig.10: Ruolo del biofilm sull'ambiente esterno

Il biofilm è quindi definibile come un conglomerato di microrganismi che si circondano di una matrice polimerica complessa, definita "slime", contenente principalmente proteine, polisaccaridi e materiale genetico.

La ricerca, nel corso degli anni, ha messo in luce il fatto che moltissime specie microbiche ed in particolare batteriche tendono ad organizzarsi in biofilm al fine di aumentare la propria resistenza agli agenti antibatterici e garantirsi, così, una maggiore sopravvivenza. Il film microbico gioca un

ruolo fondamentale nelle principali patologie di competenza odontoiatrica e proprio per questo motivo, comprendere al meglio la struttura e la biologia dello stesso è basilare ai fini della comprensione dei processi eziopatogenetici che stanno dietro al fenomeno di demineralizzazione e di conseguenza anche al processo carioso.

La formazione del biofilm orale è influenzata da fattori ambientali della bocca quali pH, temperatura e concentrazioni di sali nella saliva; per questo tutto il sistema è regolato dal “Quorum Sensing”, ovvero un sistema di comunicazione cellulare tra i batteri che serve loro a capire ed informare altri microrganismi delle condizioni dell’ambiente in cui si trovano.

Il processo di formazione del biofilm è suddiviso in diverse fasi:

1. Adesione alla superficie reversibile (adsorbimento);
2. Adesione irreversibile;
3. Formazione di microcolonie (colonizzazione);
4. Maturazione e sviluppo del biofilm;
5. Distacco delle cellule batteriche.

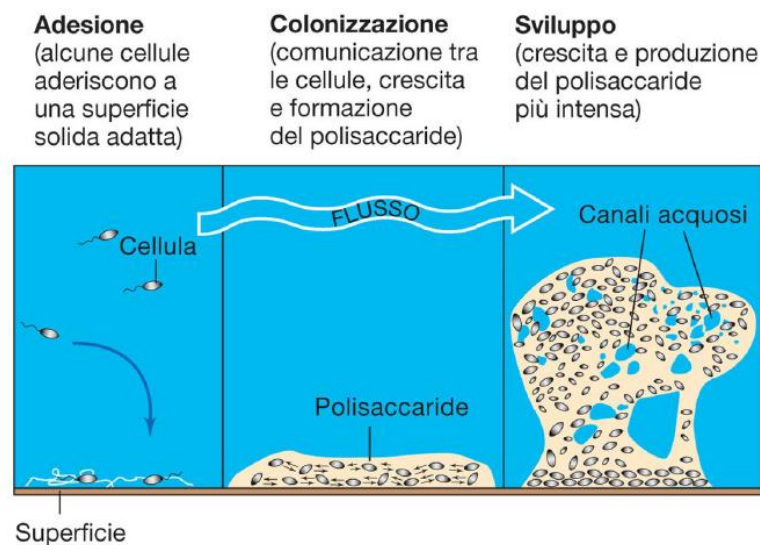


Fig.11: Fasi di formazione del biofilm

Tutto inizia con l'adesione di una cellula microbica planctonica alla superficie dentale e più precisamente ai residui presenti sulla superficie; è un processo fisico-chimico che dipende dalla distanza dei batteri dalla superficie: se la distanza è minore di 20nm avviene un legame chimico tramite forze elettrostatiche, mentre se la distanza è superiore ai 50nm il legame avviene tramite le Forze di Van der Waals e le interazioni idrofobiche.

A mano a mano che la distanza diminuisce, circa 1,5nm, si inizia ad avere un'adesione più resistente e duratura attraverso interazioni dipolo-dipolo e legami idrogeno. A questo punto la rimozione dei batteri dal sito in cui si trovano è ancora possibile, ma attraverso una forte azione meccanica come ad esempio il raschiamento della superficie dentale tramite spazzolini ad alta vibrazione o ablatori. (Galli Volontiero, 2005).

Successivamente, se non rimossi nella fase precedente, c'è un ulteriore attaccamento dei batteri alla superficie dello smalto dentale grazie allo sviluppo di adesine nella parte finale dei pili delle loro cellule, i quali favoriscono l'adesività e la formazione del biofilm creando così un monostrato di cellule batteriche adese alla superficie del dente.

A questo punto la concentrazione di batteri è in continuo aumento così come anche la concentrazione di peptidi o di AHL (molecola segnale rappresentata da un omoserina lattone acilato) attraverso il Quorum Sensing, il quale fa sì che si inizi a produrre al di fuori della cellula batterica materiale polimerico extracellulare (EPS), costituente principale della matrice del biofilm e fondamentale per la formazione di nuove micro-colonie batteriche.

Mentre quest'ultime si formano, nella matrice iniziano a crearsi dei piccoli canali, i quali servono per apportare i nutrienti alle diverse colonie formatesi ed a togliere le sostanze di scarico: in questo modo il biofilm può accrescere e maturare.

Una volta avvenuta la maturazione, i batteri in determinate condizioni ambientali, possono staccarsi dal biofilm per riprendere una forma planctonica o per riformare un nuovo biofilm in una zona diversa dalla precedente.

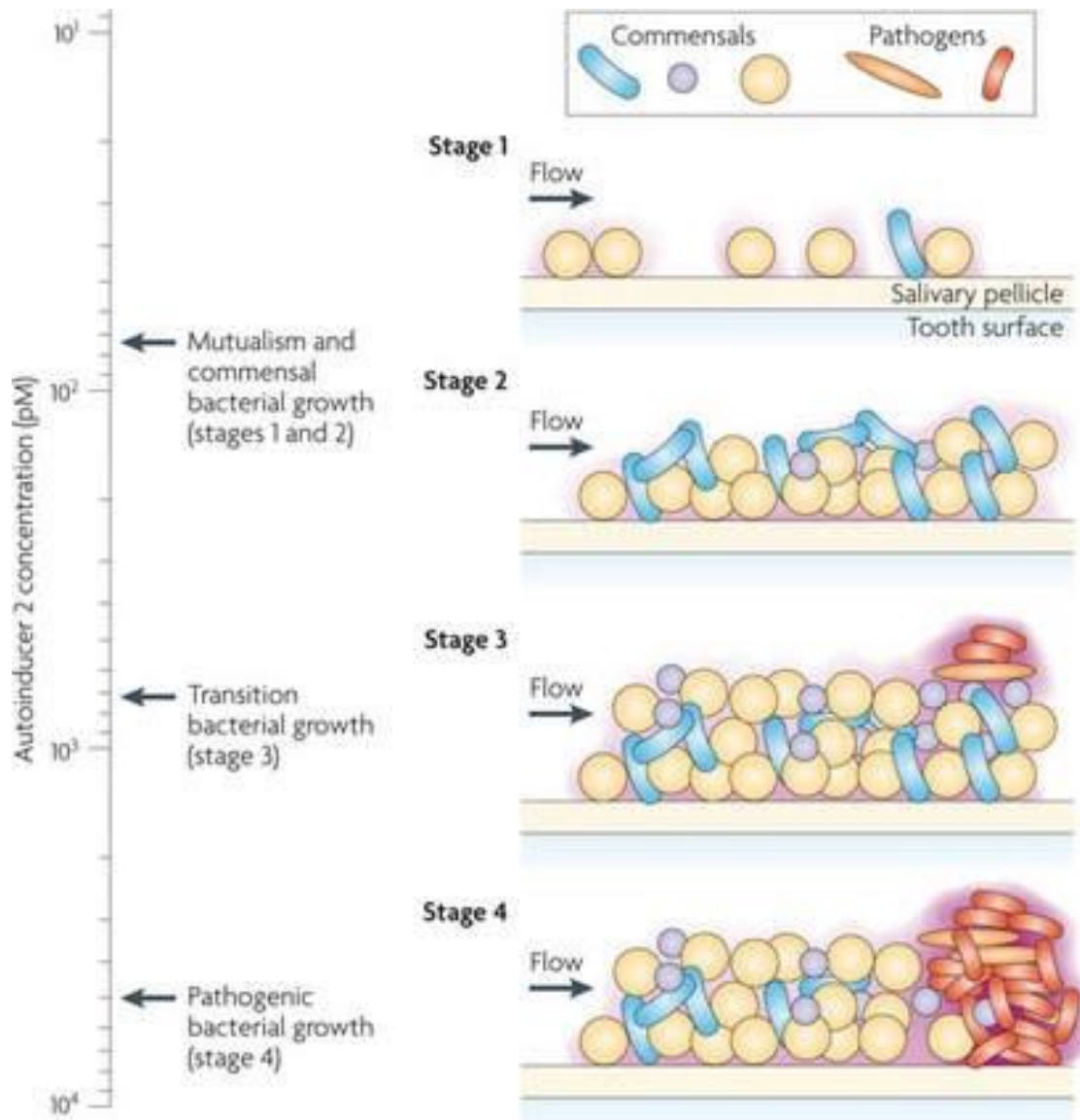


Fig.12:Fasi della formazione del Biofilm: maggior impatto visivo alla colonizzazione



Fig.13: Microfotografia al microscopio elettronico a ascansione di un biofilm che sta colonizzando una superficie di smalto. Al centro della foto possiamo osservare il fronte di colonizzazione con i microrganismi che per primi aderiscono alla superficie.

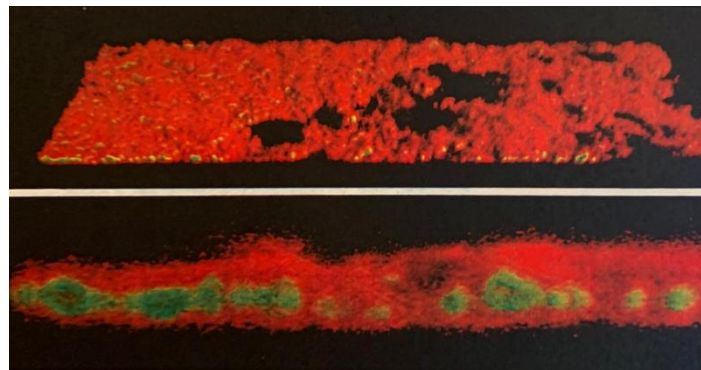


Fig.14: Microfotografia al microscopio confocale laser di un biofilm costituito da cellule di *Streptococcus mutans* (in verde) che si viluppano all'interno della matrice da loro prodotta, colorata in rosso. Essendo le condizioni di coltura sfavorevoli per la presenza di agenti antimicrobici, osserviamo come i microrganismi usino la matrice come uno scudo, isolandosi dall'azione degli agenti esterni.

In sintesi possiamo affermare che la creazione del biofilm da parte dei batteri comporta, per la specie batterica stessa, una possibilità di sopravvivenza maggiore. Come conseguenza principale, tutti i batteri cariogeni presenti nel biofilm inizieranno un processo di fermentazione dei carboidrati con conseguente formazione di metaboliti acidi responsabili della demineralizzazione della componente inorganica dello smalto (inizialmente reversibile) e della dentina. Infine, la produzione di enzimi proteolitici (amino-

peptidasi), sempre da parte dei germi presenti nel biofilm, è responsabile della disgregazione irreversibile della componente organica di smalto e, poi, della dentina.

In un'analisi del cavo orale al microscopio, dopo l'assunzione di cibo, si è visto che dopo 2-3 ore dal pasto si formano isole batteriche che si estendono a macchia di leopardo su tutta la superficie del dente. (Fig 15)

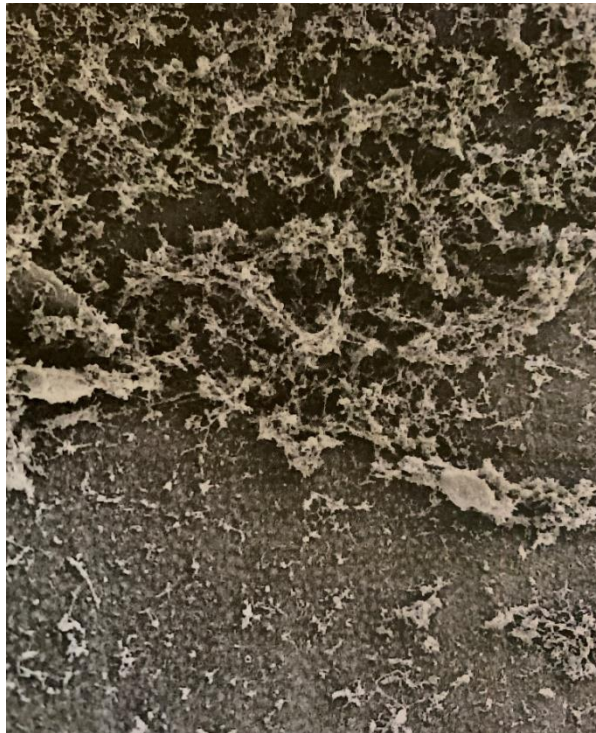


Fig.15: Isole batteriche presenti sullo smalto dentale dopo 2-3 ore dall'assunzione di cibo

Dopo 12 ore il dente appare rivestito interamente da una patina batterica di 8-10 strati di cellule, a 24 ore di distanza, gli strati di cellule arrivano a 100 e a 48 ore sono più di 300. Questa immensa popolazione batterica è tenuta unita da una impalcatura denominata placca muco-batterica che impedisce alla saliva di raggiungere la superficie del dente e svolgere la sua funzione regolatrice: eliminare il numero di batteri in eccesso e diluire gli acidi da loro prodotti.

A sopravvivere con l'aumentare dell'acidità rimangono soltanto i microorganismi resistenti agli acidi di cui sono anche forti produttori, creando così un abbassamento progressivo del pH che scende sotto il valore di pH 5.5, dando inizio al processo della demineralizzazione dello smalto tramite il deterioramento dell'idrossiapatite.

4. PATOGENESI

La patogenesi dell'erosione dentale, o fenomeno demineralizzativo, è direttamente correlata alla capacità tampone e alla velocità di secrezione della saliva; infatti, se esposti ad un ambiente acido i cristalli di HA si solubilizzeranno gradualmente, comportando una suscettibilità maggiore all'usura per i denti stessi.

Il fenomeno della demineralizzazione è un processo chimico innescato dall'attacco acido attraverso due principali vie:

- **Via intrinseca:** mediante gli **acidi prodotti dai microbi** presenti nel cavo orale (attacco microbico). Tratteremo esclusivamente l'acido lattico
- **Vie estrinseca:** mediante gli **acidi alimentari** assunti con il cibo o le bevande. Tratteremo l'acido citrico, acetico, carbossilico e fosforico i quali sono i più presenti negli alimenti.

L'effetto degli acidi può esplicarsi mediante l'effetto di un attacco acido diretto, mediante la produzione di ioni H^+ , oppure tramite reazione di chelazione.

Per quanto riguarda i denti, durante un attacco acido si innesca un processo di dissoluzione chimica sia dei componenti della matrice organica (come proteine, presenti principalmente come un sottilissimo rivestimento dei singoli cristalli di HA, e lipidi) che di quella inorganica. Tale processo è determinato principalmente dal contenuto di acqua presente nel materiale: la concentrazione di acqua nello smalto dentale e soprattutto nella dentina, dove vi è una concentrazione molto maggiore (12% vs 20%), è sufficiente

per permettere la diffusione dell'acido all'interno del dente e dei minerali, come Ca e PO₄, fuori da esso.

La dentina, rispetto allo smalto, oltre alla maggior concentrazione di acqua, possiede anche una componente di collagene di tipo I, fosfoproteine e proteoglicani; inoltre ritroviamo anche una maggior concentrazione di HA Carbonata (6% vs 3% dello smalto) e una minor dimensione dei singoli cristalli di HA che, nel complesso, comportano un maggiore sensibilità all'attacco acido.

4.1. Meccanismo d'azione degli acidi e degli agenti alchilanti

L'erosione chimica dei denti si verifica sia per effetto degli ioni H⁺, derivanti dalla dissociazione degli acidi forti e deboli, sia degli anioni che riescono a legare il Ca²⁺, i quali prendono il nome di agenti alchilanti. Gli acidi più comunemente presenti nel cavo orale sono acidi deboli, come l'acido citrico (C₆H₈O₇) o l'acido acetico (CH₃COOH); raramente ritroviamo invece un acido forte come l'acido cloridrico (HCl).

Gli ioni idronio (H⁺), che si formano per dissociazione di un acido in acqua, si legano con il carbonato o il fosfato presente nell'HA causando il rilascio di tutti gli altri anioni a quali questi gruppi erano legati.

Essendo il carbonato più reattivo del fosfato, esso richiede una minore concentrazione di idronio con il quale reagire, per questo motivo, l'HA che contiene una maggiore concentrazione di CO₃ è più suscettibile all'attacco acido.

Sono state individuate tre differenti forme di attacco chimico in funzione del valore del Ph dell'acido:

- Gli acidi forti come HCl, che possiedono un Ph ≈ 1 il quale è molto al di sotto della soglia critica di dissoluzione dell'HA dentale, sono capaci di causare la mordenzatura superficiale se esposti ai denti per un periodo di tempo brevissimo, comportandone così la demineralizzazione. Questo fenomeno viene riscontrato quasi esclusivamente nei pazienti con ripetuti fenomeni emetici come i bulimici, gli alcolisti o l'iperemesi gravidica.
- Se invece si espone la superficie del dente ad un acido con Ph compreso tra 2 e 4, quello che può verificarsi è la perdita di durezza superficiale dello smalto dentale, visibile solo a livello microscopico.
- Molto più comunemente invece ritroviamo un'esposizione ad acidi con Ph tra 4,5 e 6,9, i quali sono acidi deboli, ed agiscono danneggiando il dente mediante legame tra gli ioni H⁺ e i gruppi fosfato e carbonato, come precedentemente affermato.

Di seguito verranno trattati tutti gli acidi più comunemente responsabili del processo di demineralizzazione mediante via intrinseca e successivamente vie estrinseca, o alimentare.

4.1.1. Via intrinseca: fermentazione lattica batterica

Nel nostro cavo orale risiedono più di 300 diverse specie diverse di batteri i quali non sono visibili ad occhio nudo ma solo mediante microscopi ottici ed elettronici che sono in grado di ingrandirli migliaia di volte, svelando la loro forma e la loro struttura.

Tra questi, riferendoci principalmente a quelli che avranno un ruolo fondamentale per l'inizio del processo di demineralizzazione, assumono elevata importanza: lo *Streptococcus mutans* (batterio gram positivo altamente cariogeno e principale organizzatore della matrice extracellulare della placca muco-batterica che produce grandi quantità di polisaccaridi extracellulari, detti glucani, a partire dal saccarosio contenuto negli alimenti che mangiamo), il *Lactobacillus Acidophilus*, gli Actinomiceti ed il *Lattobacillo* che tra tutti ha il più alto potere cariogeno poiché si nutre del glucosio presente nei residui alimentari formando il lattato (o acido lattico) come prodotto di rifiuto, il quale è una sostanza completamente dannosa per le cellule di tutto l'organismo ed in particolare per lo smalto dentale al quale si lega provocandone una graduale demineralizzazione.

L'acido lattico ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$), in effetti, è un acido debole, con una costante di dissociazione "pK" di circa 3,1 e come tutti gli acidi deboli si ionizza solo parzialmente; la reazione di dissociazione è in equilibrio con la reazione inversa, nella quale la base coniugata si lega allo ione idrogeno per riformare l'acido indissociato.

Tale reazione viene indicata con una doppia freccia e sposterà l'equilibrio verso sinistra (forma indissociata dell'acido) tanto più quanto l'acido è debole:



(*HA* è un generico acido in forma indissociata e *A*⁻ la sua base coniugata).

La formula per calcolare la costante di equilibrio Pk è:

$$P_k = \frac{[H^+] \times [A^-]}{[HA]} \quad \text{[Formula 8]}$$

Più basso è il valore di questa costante e più l'acido sarà debole poiché prevarrà la reazione inversa e si avrà così una minore concentrazione di ioni idrogeno. Riassumendo quindi si può affermare che la costante di dissociazione Pk di un acido esprima la forza dell'acido stesso.

Pertanto alle condizioni di pH salivare fisiologico (6,5-7,4), più del 99% dell'acido lattico formatosi si dissocerà sotto forma di ione lattato ed idrogenione H⁺, come mostrato in figura:

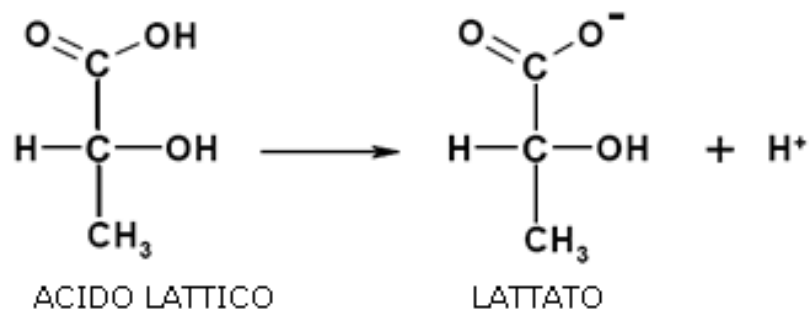


Fig.16: Formula di dissoluzione di una molecola di acido lattico

Gli elevati livelli di lattato e soprattutto la liberazione degli ioni H⁺ abbasseranno il pH e creeranno le condizioni ideali per riuscire, con la sua spiccata acidità, ad intaccare gradualmente le componenti dello smalto dentale e dar luogo quindi al processo di demineralizzazione.

4.1.2. Acido Citrico

L'acido citrico è presente, in ordine decrescente, nei seguenti alimenti:

- Succo di Limone o Lime
- Succo di Pompelmo
- Succo d'Arancio
- Coca-cola
- Succo d'Ananas
- Succo di Mela

L'acido citrico ($C_6H_8O_7$) è un acido debole che viene comunemente assunto da ognuno di noi poichè presente nella frutta, soprattutto negli agrumi quali limone, lime e arancia; ma anche nei funghi, nel vino e addirittura nel latte. Essendo tricarbossilico, ovvero contenente 3 gruppi COOH, possiede quindi 3 differenti costanti di dissociazione: $pK_{a1} = 3,1$ $pK_{a2} = 4,8$ e $pK_{a3} = 6,4$; questo ci fa capire che i tre gruppi carbossilici (COOH) si ionizzeranno progressivamente passando da un pH moderatamente acido a un pH vicino alla neutralità. La dissociazione completa di una molecola di acido citrico in acqua produce $3H^+$ totali, secondo le seguenti reazioni:

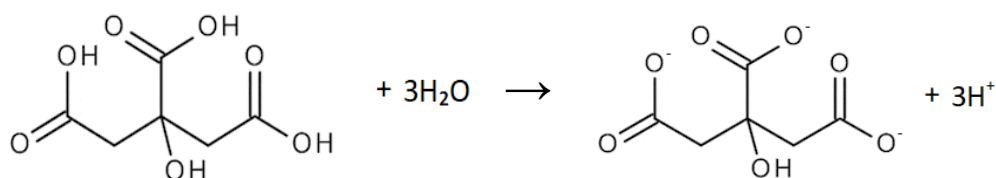
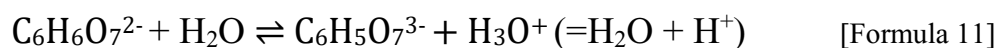
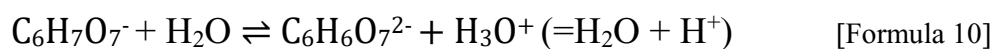
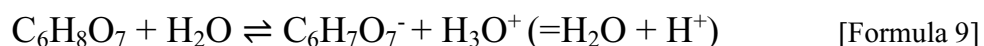
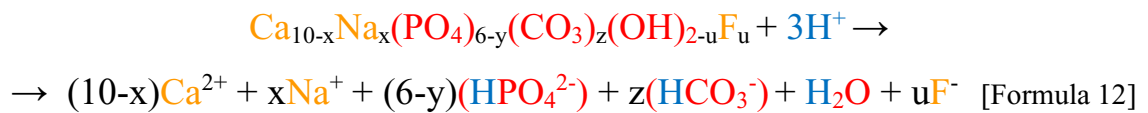


Fig.17: Formula di dissociazione completa di una molecola di acido citrico.



Formula 12: Formula che spiega il fenomeno dell'attacco acido da parte dell'acido citrico all'HA dentale. Il legame dei 3 ioni H^+ con l'HA comporta la formazione di idrogenofosfato, idrogenocarbonato ed acqua, con la conseguente liberazione di elementi come Ca^{2+} , Na^+ e F^- .

L'acido citrico però, oltre che mediante attacco acido, può anche iniziare un processo di demineralizzazione tramite l'anione citrato che va a legarsi con il Ca^{2+} dell'HA rimuovendolo così dalla superficie dentale: questo processo prende il nome di Chelazione. Infatti, il gruppo COOH dell'acido citrico, in acqua, si scinde in ioni H^+ (mediante formazione di H_3O^+), anione acido (COO^-) capace di causare la chelazione del calcio, e molecole acide non dissociate. Nel dettaglio, per l'acido citrico, sono necessarie 2 molecole di anione acido per formare un complesso chelato solubile con 3 ioni Ca^{2+} ($\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$). (Fig.18) Poiché il chelato è solubile, questo può quindi essere trasportato dalla superficie dello smalto, con conseguente perdita netta di minerali per i denti.

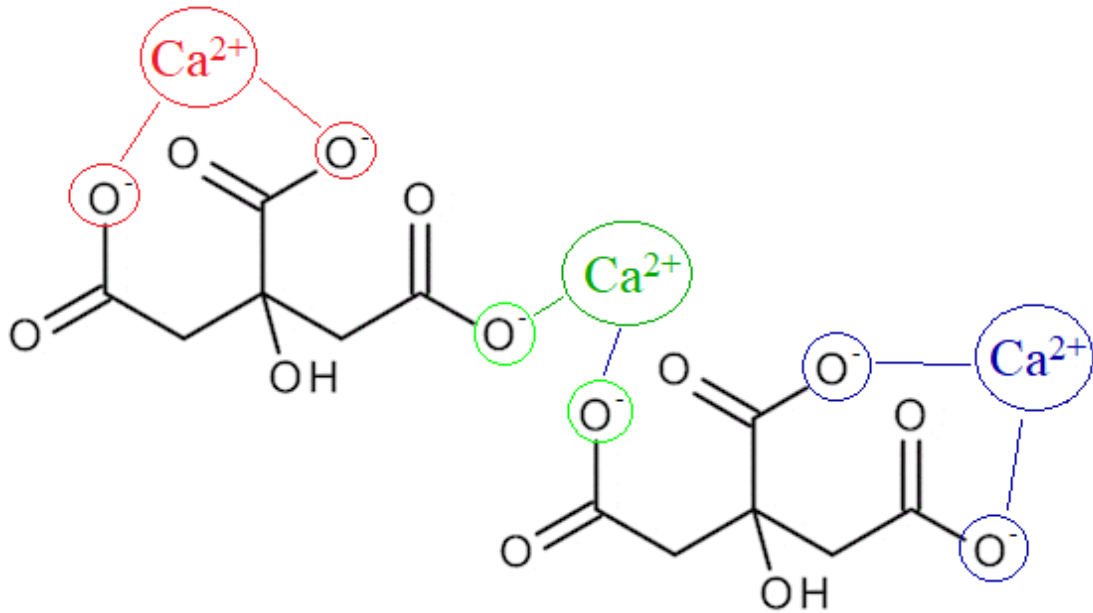


Fig.18: Rappresentazione grafica del processo di formazione di Citrato di Calcio, $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$, mediante l'utilizzo di 2 molecole di anione citrico e 3 di Ca^{2+}

Per valutare la forza di interazione tra l'anione acido ed il Ca^{2+} bisogna valutare la costante di stabilità o formazione “ β_n ”, la quale più è elevata e più è probabile che l'anione attiri il Ca dalla superficie smaltale, e quindi che vada a demineralizzare il dente.

N.B: L'acido citrico avendo 3 diversi valori di pKa si comporta diversamente in base al Ph della soluzione in cui è disciolto. Nella prima reazione (formula 9) esso agisce a $\text{Ph} \approx 2$ con un attacco acido, nella terza reazione (formula 11) agisce a $\text{Ph} \approx 7$ come chelante, mentre nella seconda reazione (formula 10) agisce a $\text{Ph} \approx 4-6$ in entrambi i modi.

4.1.3. Acido Carbonico

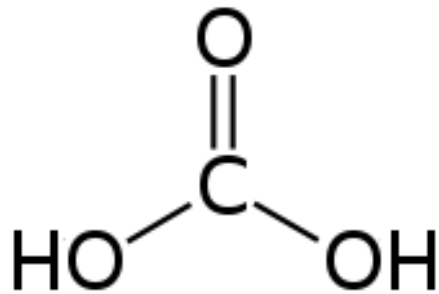


Fig.19: Rappresentazione grafica dell'acido carbonico

L'acido carbonico, H_2CO_3 , si comporta in modo simile all'acido citrico; tuttavia, essendo un acido diprotico possiede solo 2 costanti di dissociazione $pk_1=6,35$ e $pk_2= 10,3$. L'acido carbonico può dissociarsi per formare sia gli anioni bicarbonato, HCO_3^- , che lo ione carbonato, CO_3^{2-} , il che aumenta il rischio di attacco acido sui denti, andando ad aumentare la quantità di idrossiapatite carbonata. Tuttavia, la quantità di acido carbonico aggiunta alle bevande gassate ("frizzanti") è spesso troppo bassa per avere effetti significativi patologici sul dente.

4.1.4. Acido Fosforico

Sebbene il contenuto di acido carbonico nelle bibite frizzanti possa essere considerato basso, ciò che le rende dannose per i denti è la presenza di acido fosforico, contenuto in particolare nei prodotti a base di cola. L'acido fosforico, H_3PO_4 , non contiene un gruppo carbossilico ma attacca comunque i denti sia per via diretta che per chelazione. In acqua si dissociano dall'acido fosforico due ioni idronio (H^+), per l'attacco diretto dell'acido, e

una molecola di idrogeno fosfato, $\text{H}(\text{PO})_4^{2-}$, che chela i cationi di calcio in un rapporto 1:1. (Figura 20)

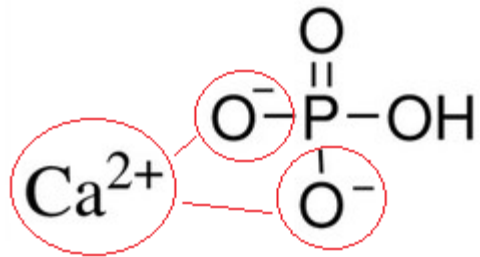
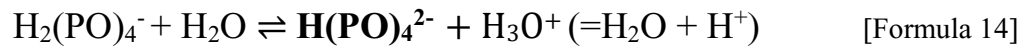
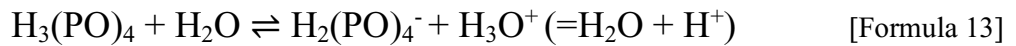


Fig.20: Rappresentazione grafica del processo di formazione di Idrogenofosfato di Calcio con un rapporto stechiometrico di 1:1.

L'acido fosforico, essendo anch'esso un acido triprotonico, può dissociarsi anche in 3H^+ e un gruppo fosfato, PO_4^{3-} , (Formula 15) che andrebbe a chelare cationi di calcio in rapporto di 2 a 3, formando fosfato di calcio solubile (Fig.21).

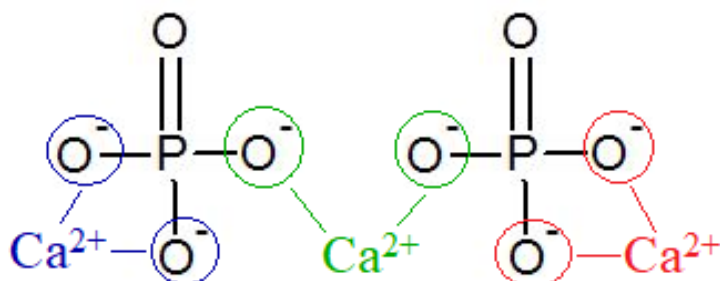
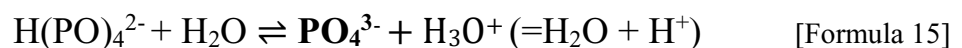


Fig.21: Rappresentazione grafica del processo di formazione di Fosfato di Calcio con un rapporto stechiometrico di 2 molecole di fosfato e 3 di Ca^{2+}

5. CLINICA

Indipendentemente dal tipo di fattori causali, un dente soggetto al fenomeno demineralizzativo ha una maggiore probabilità di rompersi o scheggiarsi se danneggiato; sono sicuramente più difficili da riparare rispetto ad un dente sano e, poichè le strutture demineralizzate sono aree di debolezza strutturale, sono anche più soggette alla formazione di una lesione cariosa.

Il fenomeno demineralizzativo può manifestarsi in maniera molto eterogenea; per esempio le prime lesioni, o aggressioni, demineralizzanti sono asintomatiche e non visibili ad occhio nudo poichè il danno è esclusivamente a livello microscopico, tuttavia, il perseguire del fenomeno induce invece manifestazioni macroscopiche, più o meno sintomatiche.

5.1. Lesione erosiva

Elemento patognomonico stesso del fenomeno demineralizzativo, poichè, si definisce come una lesione dentale con perdita graduale e, se non trattata, irreversibile dei minerali che compongono la superficie esterna dei denti. Le lesioni si possono presentare in dentizione sia decidua che permanente e nelle forme più gravi possono estendersi anche alla dentina. possono essere localizzate in un singolo dente o in una singola superficie, generalizzate, asimmetriche.

Le superfici soggette ad erosione appaiono levigate, molto lucide, prive di evidenti irregolarità: se l'erosione porta ad un assottigliamento eccessivo delle strutture dentarie, queste si possono rompere facilmente, anche se sottoposte a carichi masticatori non particolarmente intensi. A causa del suo lento e silente progresso, non è facile individuare i sintomi dell'erosione dentale nella sua prima fase di attacco: i sintomi più evidenti

infatti si manifestano quando, purtroppo, l'erosione dello smalto è già in una fase avanzata.

L'ingiallimento dello smalto dentale, la maggiore sensibilità al caldo e al freddo, la tendenza a rotture e scheggiature nonché una minore resistenza a placca e carie possono essere dei campanelli d'allarme per una lesione erosiva sottostante, occulta.

Nella fase più avanzata dell'erosione dentale, invece, i sintomi sono decisamente più evidenti e comprendono una chiara modifica della forma dei denti che, pian piano, appaiono più piccoli e corti a causa del loro consumo.

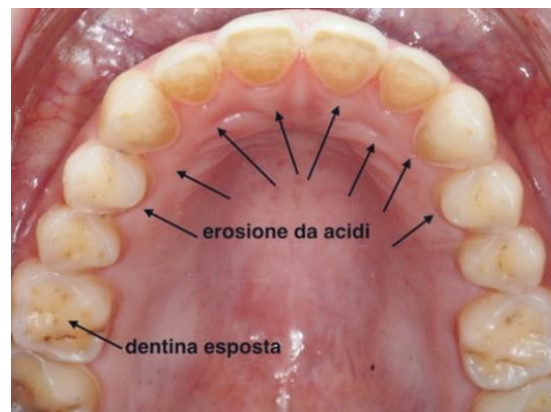


Fig.22: Fotografia di un caso in cui sono evidenti la compresenza di lesioni erosive iniziali, visibili nella porzione superiore dell'immagine, e di lesioni erosive avanzate dove si può notare un'esposizione della dentina.

Negli stadi iniziali i quadri clinici variano in base alla localizzazione della lesione mentre, negli stadi più avanzati, l'usura, indipendentemente dalla causa, è caratterizzata dalla perdita della fisiologica morfologia e anatomia dentale.

Di seguito verranno riportate delle immagini di lesioni erosive in funzione della severità e della superficie dentale.

5.1.1 Documentazione fotografica di varie lesioni erosive

Una lesione erosiva, allo stadio iniziale, a livello vestibolare si presenta come un appiattimento della superficie di aspetto vitreo e con margine incisale intatto. (Fig 23)



Fig.23: Lesione erosiva iniziale della superficie vestibolare.

La progressione della lesione porta alla perdita della fisiologica anatomia superficiale, all'aumento della traslucenza incisale e alla scheggiatura del margine incisale. Con l'aumentare della severità delle erosioni, si assiste ad un arrotondamento delle cuspidi e a scanalature più profonde dei margini incisali, fino alla perdita della morfologia occlusale/incisale.

A livello del margine gengivale possono essere presenti delle lesioni concave, di ampiezza sempre maggiore della profondità. (Fig.24)



Fig.24: Lesione erosiva sulla superficie vestibolare, margine gengivale

A livello palatale, una lesione erosiva si presenta come un'estesa decalcificazione di tutta la superficie. (Fig.25)



Fig.25: Lesioni erosive delle superfici palatali

A livello oclusale, una lesione erosiva iniziale si presenta invece con cuspidi arrotondate e superficie piatta. (Fig. 26)



Fig.26: Lesione erosiva iniziale della superficie oclusale

Negli stadi avanzati scompare la fisiologica morfologia e anatomia del dente e si apprezza una superficie piatta e cavitata in numerosi punti dello smalto. (Fig. 27)



Fig.27: Lesione erosiva avanzata della superficie occlusale

Quando l'erosione è localizzata sulla superficie occlusale, va posta in diagnosi differenziale con l'attrito che si manifesta con superfici piatte, lucide, a margini netti, presenti anche sull'elemento antagonista (Ganss C., 2006).

Quando l'erosione è localizzata invece sulla superficie vestibolare, va posta in diagnosi differenziale con l'abrasione che interessa principalmente il gradino cervicale.

La diagnosi differenziale è più difficile quando concorrono contemporaneamente agenti eziologici diversi ed è infatti doveroso ed obbligatorio ricorrere ad corretta gestione clinica che prevede una documentazione del caso attraverso fotografie e indici di usura dentale, che permettano di stabilire la gravità della lesione e di evidenziarne l'eventuale progressione. In base a questi dati poi l'odontoiatra sceglierà con maggior rigore scientifico la terapia più adatta tra l'utilizzo di sostanze protettive e il restauro dell'elemento (Carvalho TS et al., 2016).

5.2. White spots

Le white spots (letteralmente “macchie bianche”) rappresentano lo stadio iniziale di un processo demineralizzativo dello smalto dentale e vengono indicate come lesioni piatte, non cavitate e reversibili; riflettono in maniera differente la luce ed, ad occhio nudo, appaiono come zone circoscritte particolarmente evidenti.

Le white spots possono manifestarsi, a prescindere dall’età, in tutti i pazienti e le cause della loro insorgenza sono legate, in generale, a possibili traumi dentali, a forti cure antibiotiche, associate all’esecuzione di trattamenti ortodontici più invasivi o a condizioni di scarsa igiene orale.



Fig.28: White spots, maggiormente evidenti negli incisivi centrali

5.3. Sensibilità dentinale

Definita come una sensazione di dolore acuto e di breve durata che insorge dopo stimoli termici, tattili, chimici o fisici. Normalmente i tubuli dentinali non sono esposti al cavo orale, ma possono diventarlo a seguito di recessioni gengivali, erosioni ed abrasioni cervicali o problematiche parodontali. Anche alcuni trattamenti odontoiatrici possono farsi causa di sensibilità sbiancamenti dentali, otturazioni, levigature delle radici, ma anche una semplice ablazione del tartaro.

5.4. Conseguenze cliniche legate alla demineralizzazione

Il fenomeno della demineralizzazione se protratto nel tempo e lasciato agire, poichè non trattato, può condurre ad importanti conseguenze:

- **Carie dentaria:** la più frequente e diffusa patologia a carico dei denti; consiste in una continua e progressiva perdita, o distruzione, dei tessuti duri del dente che, inizialmente, si manifesta come una lesione demineralizzante circoscritta all'area smaltale e che, poi, può sfociare in una vera e propria lesione cavitaria.
- **L'abrasione:** viene definita come una perdita di sostanza dentale determinata da insulti di origine meccanica. E' maggiormente evidente nel colletto dei denti, dove lo spessore dello smalto è minimo, e nella zona occlusale poichè sottoposta all'attrito della masticazione. Le abrasioni rappresentano un problema sia estetico che strutturale in quanto comportano un indebolimento della struttura dentaria

6. DIAGNOSI

Per diagnosticare ma soprattutto per classificare clinicamente le lesioni demineralizzanti si utilizzano indici di usura basati sull'esame visivo delle superfici dei denti ai quali è attribuito un punteggio in base a quanto sono estese, alla gravità ed a dove sono localizzate.

6.1 Scale di valutazione ed indici clinici

Il primo indice, introdotto nel 1968 da Eccles e Jenkins, classifica le lesioni in iniziali, piccole e avanzate analizzando singolarmente le 4 superfici dentali: palatale/linguale, buccale, cervicale, incisale/occlusale.

Successivamente sulla base di questo indice, nel 1984 Smith and King proseguirono con le ricerche e ne svilupparono uno nuovo: il "Tooth Wear Index" (TWI), utilizzato poi anche oggi in numerosi protocolli clinici.

Il TWI, riportato nella tabella 3, analizza separatamente le 4 superfici di ogni dente assegnando ad ognuna di esse un punteggio che va da 0 (assenza delle lesioni) a 4 (completa perdita di smalto con annessa esposizione dentale e pulpare). Il punteggio ottenuto dalla somma dei valori di ogni superficie dentale viene comparato con una serie di punteggi massimi stabiliti in fasce d'età. Questo indice ha come limite l'utilizzo confinato a soggetti adulti poiché la prima fascia di età va dagli 0 ai 25 anni; inoltre non tiene conto dell'eziologia delle erosioni. Successivamente, a causa di questo limite, numerosi studi hanno iniziato ad utilizzare una versione modificata del TWI, aggiungendo nuovi parametri come la presenza di restauri estesi e l'assenza degli elementi dentali.

SCORE	SUPERFICIE	CRITERI
0	B/L/O/I C	Senza perdita della superficie smaltale. Senza perdita di contorno.
1	B/L/O/I C	Minima perdita della superficie smaltale. Minima perdita di contorno.
2	B/L/O I C	Perdita dello smalto con esposizione della dentina per meno di 1/3 della superficie. Perdita di smalto con minima esposizione della dentina. Perdita di sostanza inferiore ad 1mm di profondità
3	B/L/O I C	Perdita dello smalto con esposizione della dentina per più di 1/3 della superficie. Perdita di smalto con perdita sostanziale della dentina. Perdita di sostanza compresa tra 1 e 2 mm di profondità
4	B/L/O I C	Perdita completa dello smalto, polpa e dentina secondaria esposte. Esposizione della polpa o della dentina secondaria Perdita di sostanza superiore a 2mm di profondità, con esposizione della polpa o della dentina secondaria

Tab.3: TWI score. B = buccale, L = linguale, O = occlusale, I = incisale e C = cervicale

Nel 1996 Lussi ha introdotto un nuovo indice, come estensione del TWI, nell'obiettivo di differenziare le lesioni da erosione da quelle da attrito e da abrasione sin dalle fasi iniziali. Partendo dall'assunto che le lesioni erosive in un primo momento interessano le superfici palatali o linguali, attribuisce punteggi diversi alle stesse lesioni in base alla loro localizzazione.

Per le superfici linguali/palatali il grado 1 corrisponde alla perdita dello smalto, il grado 2 al coinvolgimento della dentina per meno della metà della superficie e il grado 3 per più della metà.

Per le superfici occlusali il grado 1 corrisponde ad una lieve erosione senza interessamento della dentina, il grado 2 ad una severa erosione con interessamento della dentina.

Nel corso degli anni sono state introdotte altre classificazioni: attualmente l'indice più utilizzato è il BEWE score (Barlett D et al, 2008),

che analizza tutte le superfici degli elementi dentali (escluso il terzo molare) attribuendo per ogni superficie dentale, il punteggio da 0 (elemento sano) a 3 (perdita di tessuto duro $\geq 50\%$); l'indice assegna, per ogni sestante, solo il punteggio più alto, e identifica il grado di rischio e la terapia consigliata. Il limite maggiore della scala BEWE è la mancata distinzione tra smalto e dentina.

SCORE	CRITERI
0	Nessuna lesione erosiva
1	Iniziale perdita di tessuto superficiale
2*	Perdita tessuto duro $<50\%$ della superficie
3*	Perdita tessuto duro $\geq 50\%$ della superficie

*spesso coinvolta anche la dentina

Tab.4: Score BEWE

Tutti gli indici utilizzati presentano dei limiti e ad oggi non è ancora disponibile un indice ideale che permetta di valutare l'eziologia delle lesioni ponendo una diagnosi differenziale dall'attrito e dall'abrasione e che egistri eventuali modifiche della perdita di tessuti nel tempo.

6.2 Analisi Strumentale

Per fare diagnosi di demineralizzazione non vengono generalmente utilizzate indagini strumentali ma, come precedentemente espresso, è la clinica che permette di individuare il processo demineralizzativo, insieme a tutte le sue varianti. Ovviamente, essendo la diagnosi legata quasi esclusivamente all'ambito clinico: anamnesi ed esame obiettivo, risulterà molto più difficile individuare un processo demineralizzativo appena insorto.

Tuttavia, talvolta, vengono impiegate tecniche che permettono l'ottenimento di dati molto più oggettivabili, al fine di dimostrare l'efficacia del trattamento; queste tecniche di diagnostica strumentale vengono principalmente applicate in ambito sperimentale.

Test di MICRODUREZZA
Test di PROFILOMETRIA SUPERFICIALE
Test di RUGOSITA' SUPERFICIALE
MICRORADIOGRAFIA
Microscopia A FORZA ATOMICA (AFM)
Microscopia A SCANSIONE ELETTRINICA (SEM)
INTERFEROMETRO A LUCE BIANCA (WLI)
Microscopia a SCANSIONE LASER CONFOCALE

► TEST DI MICRODUREZZA

Il test di microdurezza ha un costo relativamente basso e può essere combinato con altre misure perché è una tecnica non distruttiva.

Questa tecnica può valutare le prime fasi della dissoluzione dello smalto e della dentina, che sono associate all'indebolimento della superficie. In questo test, una punta diamantata fine a forma piramidale di geometria nota viene spinta nella superficie dello smalto o della dentina con un carico definito. Ciò si traduce in una rientranza nella superficie del dente e la misura del diametro della rientranza indica la microdurezza, che viene misurata con una scala micrometrica incorporata nella parte oculare del microscopio. La microdurezza è il valore della resistenza dello smalto o della dentina alla deformazione plastica locale.

I metodi di microdurezza più utilizzati sono i test di durezza Knoop e di durezza Vickers, che si differenziano solo per la forma delle sonde diamantate: Knoop è romboidale, mentre Vickers è tetrapiramidale.

Il test di microdurezza Knoop è più sensibile alla durezza superficiale rispetto a molti altri test di durezza convenzionali ed è adatto per la misurazione di materiali come l'idrossiapatite, il componente principale dello smalto dentale.

► TEST DI PROFILOMETRIA SUPERFICIALE (MP)

È un metodo per misurare la perdita di smalto o dentina causata da erosione e/o abrasione, la quale può essere in forma di contatto o senza contatto. In questa tecnica, i campioni vengono coperti da un lato con un nastro protettivo, creando una cosiddetta area di riferimento, e l'altra parte del campione rimane scoperta per determinare l'usura dentale. Questa area di riferimento può essere un sottile strato di resina composita, senza mordenzatura acida e senza sistema adesivo utilizzato, oppure può utilizzare smalto

to per unghie. Pertanto, la profilometria misura il dislivello (Δh) tra l'area esposta e il riferimento. Il principale vantaggio della profilometria è la rapidità delle misurazioni che richiedono circa un minuto per campione. La profilometria meccanica (MP) è ampiamente utilizzata per valutare i cambiamenti nella superficie dei denti dopo l'abrasione e/o l'erosione. Tuttavia, la forza applicata dalla sonda su una superficie ammorbidita dall'erosione può far collassare l'area. Questo effetto sarebbe particolarmente forte su campioni con demineralizzazione relativamente grave. I valori esacerbati ottenuti da MP vengono evitati utilizzando una profilometria senza contatto - ottica o laser - guidata da un computer, che può determinare la perdita di superficie con elevata precisione. Tuttavia, questa attrezzatura è molto costosa ed è necessario avere molta esperienza nell'utilizzo del sistema.

Riassumendo, la profilometria è un metodo rapido e non distruttivo, che può essere adottato per determinare l'usura con elevata precisione.

► TEST DI RUGOSITA' SUPERFICIALE (SR)

La rugosità superficiale è un metodo che può essere adottato per valutare l'alterazione superficiale della struttura dello smalto/dentina dopo diversi trattamenti erosivi o abrasivi. I dati della misura della rugosità sono espressi in valori Ra (Media rugosità – μm). La rugosità di base e finale è la media delle misurazioni nei campioni rispettivamente prima e dopo il trattamento. La rugosità viene calcolata sottraendo le misurazioni di base dai valori post-trattamento. Tuttavia, questa misurazione non consente di conoscere la perdita della struttura.

Questa tecnica è poco utilizzata perché dà informazioni superficiali.

► MICRORADIOGRAFIA

Il principale vantaggio della microradiografia è che il metodo consente di determinare simultaneamente:

- la perdita di superficie;
- la demineralizzazione;
- la remineralizzazione dei campioni erosi.

Generalmente viene utilizzata per quantificare la perdita di minerali in base all'attenuazione dell'irradiazione di raggi X che trasmette il tessuto duro dentale. Le microradiografie sono ottenute con un sistema di analisi digitale delle immagini interfacciato con un microscopio universale e un personal computer. Possono essere longitudinali quando i raggi X sono paralleli alla direzione del processo. Il trasversale è quando i raggi X sono perpendicolari alla direzione di progressione della lesione.

► MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA (AFM) E NANOINDENTAZIONE AFM

Recentemente è stato introdotto l'uso della microscopia a forza atomica (AFM), e in particolare della nanoindentazione AFM, nella ricerca biologica.

L'AFM fornisce un potente strumento per studiare la morfologia delle superfici di una varietà di campioni biologici con risoluzione nanometrica. Esistono due tipi di scansione AFM: modalità tocco e modalità contatto. La modalità tocco AFM è stata applicata con successo allo studio delle alterazioni dello smalto poiché è in grado di fornire immagini ad alta risoluzione dello smalto dei denti e, quindi, a differenza della profilometria meccanica, consente anche di quantificare la perdita di smalto dentale causata dalla demineralizzazione.

Negli ultimi cinque anni, l'AFM e la nanoindentazione hanno rivoluzionato lo studio dell'erosione dello smalto indotta dagli alimenti: oltre quindi ad essere un supporto notevole per gli studi microscopici riguardanti l'erosione dentale, i risultati di questi studi sono stati applicati per sviluppare nuove bevande analcoliche con ridotto potenziale erosivo.

► MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)

Questo metodo consente solo una valutazione soggettiva e qualitativa. Alcuni studi utilizzano l'analisi SEM per illustrare la superficie soggetta ad erosione e demineralizzazione su una struttura dentale.

I campioni di smalto/dentina esaminati al SEM devono essere rivestiti con uno strato conduttivo, normalmente costituito da oro. Inoltre, il SEM non consente misurazioni quantitative della perdita di smalto. L'indagine SEM può essere utilizzata su superfici native sia lucidate che non lucidate solo dopo la spruzzatura dell'oro. Tuttavia, è un'analisi distruttiva, perché una volta ricoperto d'oro, il campione non può essere utilizzato per altre analisi.

► INTERFEROMETRO A LUCE BIANCA (WLI)

Un interferometro a luce bianca è un microscopio ottico computerizzato che utilizza l'interferenza per produrre un'immagine topografica della superficie.

Le immagini WLI digitali sono generalmente mostrate come una mappa topografica in cui vari colori denotano altezze diverse per il pixel, come registrato dallo stesso software WLI. Sottraendo l'immagine originale dall'immagine ottenuta dopo l'esperimento, viene creata un'immagine differenza che mostra quanto smalto era stato rimosso durante le fasi erosive.

Utilizzando WLI è anche possibile calcolare la rugosità media superficiale dovuta alla mordenzatura dello smalto.

Il WLI, riassumendo, è uno studio quantitativo che può benissimo essere utilizzato per misurare le lesioni da demineralizzazione poiché riesce ad individuarne bene la rugosità e l'usura.

► MICROSCOPIA A SCANSIONE LASER CONFOCALE

La microscopia confocale è una tecnica di topografia microscopica tridimensionale non distruttiva usata per ottenere immagini ad alta risoluzione.

Il principio confocale si basa sull'eliminazione della luce diffusa dai piani fuori fuoco mediante aperture confocali e le immagini sono ottenute scansionando il campione con un raggio laser di dimensioni spot e registrando la luce riflessa dal piano a fuoco.

La microscopia a scansione laser confocale viene utilizzata negli studi sull'erosione/demineralizzazione poiché fornisce immagini istotomografiche che consentono la valutazione qualitativa e l'interpretazione della distruzione dei tessuti duri o della dissoluzione dei minerali, poiché la riflessione e la diffusione della luce dei campioni di tessuto duro sono influenzate dai cambiamenti microistologici all'interno di un campione di dente.

***CAPITOLO III:
LA REMINERALIZZAZIONE***

1 DEFINIZIONE

Con il termine remineralizzazione, relativamente a tutti i tessuti mineralizzati, ci si riferisce ad un processo spontaneo o indotto che conduce alla deposizione di minerali, sotto forma di ioni, all'interno di una struttura cristallina, di cui diventano parte integrante.

In ambito odontoiatrico è il processo terapeutico del fenomeno demineralizzativo, poichè si oppone alla perdita di minerali da parte dei tessuti duri del dente (come smalto e dentina) favorendone, invece, una loro deposizione sotto forma di cristalli di HA poichè si invertono i gradienti di fosfato e di calcio, che verranno quindi rilasciati all'interno della struttura demineralizzata.

A livello dentario il processo di remineralizzazione avviene quotidianamente ed in modo costante grazie all'azione della saliva, la quale, dopo gli attacchi acidi legati all'azione dei batteri, innalza il Ph favorendo la reintegrazione dei minerali persi come conseguenza del suo abbassamento: tuttavia, questo processo necessita di un buon controllo dell'igiene orale, del biofilm batterico, della dieta e dei fattori ambientali predisponenti carie, perché altrimenti il fenomeno di demineralizzazione prenderebbe il sopravvento e la perdita di minerali diventerebbe molto più consistente.

2 LINEE GUIDA GENERALI

Come esposto nel paragrafo 6.1, utilizzare la classificazione BEWE può essere molto utile all'odontoiatra per comprendere come gestire un paziente con un processo demineralizzativo patologico in atto; infatti, in base alla severità del quadro si potrà intervenire in maniera differente, andando per esempio a correggere i fattori di rischio ed intervenire con un'igiene dentale nei casi più lieve, passando per l'utilizzo di dentifrici o paste contenenti materiali favorenti il processo remineralizzativo nei casi più avanzati, oppure direttamente ai trattamenti restaurativi nel caso in cui ci si trovi di fronte ad una situazione troppo compromessa.

Punteggio BEWE cumulativo	Trattamento
Basso: 3-8	Igiene orale Valutazione dietetica e dei rischi
Medio: 9-13	Utilizzare prodotti remineralizzanti
Alto: >14	Considerare interventi restaurativi

Tab.5: Schema terapeutico in base alla classificazione BEWE

3 AGENTI REMINERALIZZANTI

Nel caso in cui il processo demineralizzante abbia creato una sintomatologia, anche se di lieve entità, è opportuno ricorrere ad approcci terapeutici che producano effetti remineralizzanti, al fine di prevenire il danno irreversibile che si instaurerebbe se il fenomeno demineralizzante venisse lasciato agire.

Questi trattamenti normalmente coinvolgono sostanze in grado di bloccare gli agenti demineralizzanti, di promuovere la formazione di cristalli di idrossiapatite più resistenti, di sovrassaturare l'ambiente orale di sostanze componenti i tessuti duri dei denti (principalmente calcio e fosfati) o di svolgere una vera e propria azione biomimetica sulla superficie. I cristalli remineralizzati andranno perciò poi a riacquisire porzioni andate perdute e gli ioni lasciati da queste sostanze entrano a far parte delle strutture cristalline, diventandone funzionalmente integranti, in alcuni casi, con una vera e propria "restitutio ad integrum".

Negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi principi attivi che vengono descritti come in grado di interagire con le superfici demineralizzate dei tessuti duri dei denti a tal punto da ricostruirle, rigenerarle, ripararle. Al di là della comunicazione commerciale dei singoli prodotti, restituire minerali allo smalto e alla dentina danneggiati è sicuramente possibile, anche se vanno conosciuti preventivamente quelli che sono i meccanismi biologici che regolano i processi di remineralizzazione dentaria e, di conseguenza, quali principi attivi possono essere più efficaci rispetto ad altri.

In questo paragrafo verranno riassunti molto brevemente i materiali più utilizzati e più efficaci, per poi trattarli successivamente più nel dettaglio.

In primo luogo, l'impiego di **fluoruri** ha una riconosciuta azione preventiva della demineralizzazione, in quanto induce la conversione

dell'idrossiapatite in fluoroapatite depositandosi così sulla superficie dello smalto.

Sulla base delle evidenze a riguardo sono stati messi a punto prodotti remineralizzanti a uso topico contenenti **calcio e fosfato**: come il β -fosfato tricalcico, il glicerolfosfato (CaGP), i fosforil oligosaccaridi del calcio (contenuti in alcuni chewing-gum) o il complesso CPP-ACP, derivato dal latte.

Sono inoltre stati proposti anche prodotti **contenenti nanoparticelle di idrossiapatite**, indicati nel trattamento, almeno parziale, di lesioni demineralizzanti già in atto all'interno del cavo orale.

Infine vanno citati **anche prodotti biologicamente attivi**: in primo luogo i biovetri, composti a base di sodio, silicati, calcio e fosfati. In ambiente acquoso, il sodio viene scambiato con idrogenioni, inducendo un rialzo del pH, questo cambiamento induce poi la liberazione di ioni calcio e quindi un effetto remineralizzante. Nei composti contenenti silicio e calcio come Ca_2SiO_4 e Ca_3SiO_5 alcuni studi in vitro hanno osservato che lo scambio degli ioni calcio con gli idrogenioni, portando ad un innalzamento del pH, induce la formazione di gruppi silanici Si-OH in forma attiva. Così facendo gli ioni calcio si depositano su questo layer, venendo dall'altra parte a trovarsi a contatto con l'ambiente: si arriverà perciò ad avere la precipitazione dell'idrossiapatite e cioè la vera e propria remineralizzazione.

Un' altro metodo che si può utilizzare per fare prevenzione e cura contro la demineralizzazione dentale è la **caseinoprofilassi**; tale tecnica apporta benefici desensibilizzanti e preventivi (il dente arricchito di minerali riesce a resistere meglio al continuo attacco di acidi che portano alla formazione della carie).

3.1 Fluoro

Il fluoro è stato impiegato per moltissimi anni in odontoiatria per proteggere lo smalto dentario. Tre sono le sue funzioni principali:

- ~ promuovere la remineralizzazione
- ~ ostacolare i processi di demineralizzazione
- ~ svolgere un'azione antibatterica

Il fluoro è ormai diventato un componente fondamentale di dentifrici, collutori e numerosi prodotti professionali come vernici e gel da fluoroprofilassi, e il suo impiego su larga scala ha portato, in maniera indiscutibile, il grande beneficio di ridurre l'incidenza della patologia demineralizzativa nella popolazione mondiale. Proprio come conseguenza delle numerose ricerche a sostegno dell'impiego del fluoro come mezzo fondamentale per la prevenzione delle patologie dentarie, il Ministero della sanità italiana ha emanato nel 2008 le "Linee guida nazionali per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età evolutiva", successivamente aggiornate nel 2013, nelle quali il gruppo di lavoro incaricato dallo stesso Ministero ha chiaramente indicato come l'impiego quotidiano di un dentifricio contenente almeno 1000 ppm (parti per milione) di fluoro sia uno strumento fondamentale e imprescindibile per la prevenzione della carie nei bambini, ribadendo poi lo stesso concetto anche per gli adulti nelle linee guida a essi dedicate.

Il fluoro può agire contro la demineralizzazione poiché è in grado di ridurre la solubilità dello smalto e della dentina. È stato dimostrato, infatti, che può indurre la formazione di fluoroapatite (FA) o di idrossiapatite fluorata (FHA), che sono dei cristalli molto meno solubili rispetto all'idrossiapatite stechiometrica (HA), concetto spiegato nel dettaglio nel paragrafo 1.2 del capitolo I, "idrossiapatite". La formazione di FA tramite

l'utilizzo di composti fluorati topici è, tuttavia, limitata solamente agli strati più esterni dello smalto e della dentina, svolgendo proprio su questi strati un'azione anticarie: non solo infatti previene la dissoluzione degli strati superficiali esposti all'ambiente orale, ma favorisce anche la remineralizzazione attraverso la promozione della precipitazione di apatite.

Il meccanismo d'azione del fluoro sostenuto dal Ministero della salute è piuttosto semplice: durante lo spazzolamento con un dentifricio contenente fluoro, il medesimo viene rilasciato in diverse parti del cavo orale quali saliva, superfici dentarie, tessuti molli, materiali e dispositivi protesici, ma anche nel contesto del biofilm batterico; così facendo, con un utilizzo ripetuto nel tempo, il fluoro può entrare a far parte della struttura cristallina dell'idrossiapatite, formando fluoroapatite. Tuttavia, il fluoro agisce anche con un meccanismo più semplice: durante lo spazzolamento infatti forma con il calcio dei sali di fluoruro di calcio (CaF_2) che precipitano nel cavo orale andando a costituire una riserva di fluoro che protegge il sottostante strato di smalto dall'azione acida. In sintesi: se il pH si abbassa, il fluoro viene liberato dal fosfato di calcio, andando a sopprimere l'effetto demineralizzante dei batteri acidogeni nel microambiente orale; mentre quando poi esso risale, la presenza di fluoruro libero guida la formazione di nuovi minerali. Il fluoro riesce anche a penetrare all'interno del biofilm batterico, dove può essere trattenuto dai batteri o dai frammenti di batteri da legami con atomi di calcio, svolgendo un'azione antibatterica e costituendo un'ulteriore riserva di fluoro. A prova di quest'azione sui batteri, diversi studi clinici hanno mostrato come vi sia una correlazione inversa fra la concentrazione di fluoro nella placca e la prevalenza della carie dentaria.

Parecchi studi hanno dimostrato che l'impiego di un dentifricio contenente almeno 1450 ppm di fluoro, in maniera quotidiana e prolungata nel

tempo, conferisce una protezione significativa allo smalto contro erosione dentale e attacchi acidi se comparato a un dentifricio senza fluoro.

Relativamente ai prodotti professionali, sicuramente vanno ricordati i dentifrici ad alto contenuto di fluoro (> 1500 ppm), le vernici e i gel, oltre ai materiali che rilasciano fluoro. I **dentifrici ad alto contenuto di fluoro** sono prodotti che normalmente vengono venduti al paziente dietro prescrizione medica; il contenuto particolarmente elevato potrebbe infatti causare effetti collaterali se i prodotti non sono utilizzati correttamente. Essi si sono rivelati utili per incrementare il livello di fluoruro nella saliva durante l'arco della giornata, cambiare l'acidogenicità della placca interprossimale, incrementando l'attività tampone della saliva e diminuendo il livello di Streptococci mutans. Tuttavia, questi dentifrici ad alto contenuto di fluoro, sebbene abbiano rivelato un buon potere anticarie e risultino particolarmente consigliati soprattutto nei soggetti ad alto rischio, non hanno mostrato uno spiccato potere remineralizzante delle lesioni cariose iniziali a livello occlusale, ovvero dove si formano più spesso le carie nei soggetti giovani ma hanno mostrato un certo potere remineralizzante sulle lesioni cervicali e interprossimali. I dentifrici ad alto contenuto di fluoro nascono per un utilizzo quotidiano prolungato, ma per periodi che devono essere determinati dallo specialista. Essi coincidono con il persistere di un particolare fattore di rischio (per esempio, il posizionamento di un'apparecchiatura ortodontica) o con una fase della crescita in cui sia particolarmente difficile ottenere la compliance del paziente. I protocolli di utilizzo più comune sono pertanto cicli di esposizione periodici, alternati a dentifrici a più basso contenuto di fluoro, per evitare un'esposizione troppo elevata all'elemento che può determinare fluorosi o effetti tossici.

I **gel** e le **vernici al fluoro** sono sempre stati molto utilizzati in odontoiatria. In particolare, le vernici con 22.500 ppm di fluoro si sono dimo-

strate in grado di inibire la proliferazione batterica sulle zone trattate, di incrementare la durezza superficiale di smalto e dentina trattati e di promuovere la formazione di fluoroapatite superficiale. Il trattamento è generalmente indicato per i pazienti ad alto rischio di carie ed il beneficio delle vernici al fluoro si mantiene ripetendo l'applicazione periodicamente (dai 3 ai 6 mesi a seconda del rischio individualizzato del paziente e delle raccomandazioni dei diversi produttori), in quanto il prodotto è destinato comunque a dissolversi per l'azione di saliva, placca e spazzolamento. Per questo motivo, la remineralizzazione mediata dalle vernici è piuttosto inconsistente, in quanto manca una frequenza elevata di applicazione. Nelle vernici attualmente utilizzate, nuovi polimeri (carrier) in cui le medesime sono dissolte contribuiscono a una maggiore durata dei prodotti.

Altri **prodotti professionali a lento rilascio** rappresentano sicuramente un ambito molto interessante per l'utilizzo del fluoro a scopi remineralizzanti. I più noti in questo ambito sono sicuramente i cementi vetroionomerici i quali vengono comunemente utilizzati come sigillanti, sottofondi di ricostruzioni, materiali cementanti e da ricostruzione provvisoria e permanente. Si sono mostrati in grado di rilasciare lentamente il fluoro in essi contenuto, ma anche di indurre un'efficace remineralizzazione quando posti a contatto di pareti cavitari demineralizzate o francamente costituite da dentina rammollita. In realtà, si è visto come la quantità di fluoro rilasciata da un cemento vetroionomerico è massima nei primi giorni dal posizionamento, e tende via via a ridursi nel tempo, pur mantenendosi in maniera permanente anche se a livelli trascurabili. Non sembra quindi il rilascio di fluoro è il fattore fondamentale che consente ai cementi vetroionomerici di essere considerati i materiali di prima scelta per sigillanti e ricostruzioni nei soggetti ad alto rischio, quanto piuttosto la loro capacità di “fondersi” letteralmente in maniera chimica con le strutture dentarie, anche se deminera-

lizzate, ed isolare i tessuti dentali dall'azione demineralizzante degli attacchi acidi, sigillandoli. L'effetto remineralizzante di un cemento vetroionomerico sembrerebbe dovuto agli innumerevoli scambi ionici nell'interfaccia materiale - dente, dove il fluoro sarebbe solo uno degli attori, ma non il protagonista. Va ricordato come il rilascio di fluoro da parte di un cemento vetroionomerico può essere ricaricato dall'applicazione sulla superficie del restauro di una vernice o di un gel al fluoro; in questo modo il fluoro può passare all'interno del cemento vetroionomerico ed essere rilasciato lentamente. Grazie a ciò, un utilizzo combinato di vernici al fluoro e cementi vetroionomerici è auspicabile per il trattamento remineralizzante ed occlusivo.

3.2 Calcio e fosfato

Il calcio e il fosfato giocano un ruolo determinante nel mantenere in equilibrio i processi di demineralizzazione e remineralizzazione che avvengono quotidianamente nel cavo orale. Il livello di questi due elementi è infatti inversamente proporzionale all'incidenza di carie; ed un'alta concentrazione di calcio nella saliva ha un effetto protettivo contro carie e usura dentale. La spiegazione che viene normalmente data a questo fenomeno è che la presenza di calcio, e anche di fosfato, in elevata quantità nella saliva può ridurre la solubilità dello smalto e spingere verso un processo di remineralizzazione. La sovrasaturazione dell'ambiente salivare sposterebbe gli equilibri portando numerosi ioni (oltre al calcio, fosforo ma anche fluoro, magnesio e stronzio) a penetrare nel contesto dei cristalli di idrossiapatite, riducendo le porosità di superficie e incrementando la durezza superficiale dei tessuti dentali. Il calcio e il fosfato in sé non sono tuttavia utilizzabili in forma libera come prodotti per la remineralizzazione, poiché precipiterebbero rapidamente o andrebbero dispersi in fretta, e non avrebbero possibilità di legarsi alle strutture dentarie. Per essere sfruttati a scopo remineralizzante, il calcio e il fosfato devono essere contenuti in composti idonei a renderli fruibili. Uno dei primi tentativi ha coinvolto degli oligosaccaridi fosforilati di calcio utilizzati in compresse, vernici o più semplicemente chewing gum. L'utilizzo di questi composti si è rivelato utile nella remineralizzazione anche delle white spot, anche in associazione al fluoro, in quanto in grado di provocare un aumento della biodisponibilità di calcio a livello salivare. L'esposizione a questi principi attivi deve essere costante e i protocolli di utilizzo prevedono normalmente un uso quotidiano.

Molto diffusi in ambito rigenerativo sono anche i composti a base di tricalciofosfato (TCP) o beta-tricalciofosfato (β -TCP). Anche questi sono in grado di rilasciare calcio, ma il loro impiego è concentrato per lo più in campo rigenerativo osseo e non come remineralizzante dentale.

Ben più rilevanti in campo dentale sono i composti a base di calcio-fosfato amorfo (ACP) e le idrossiapatiti modificate.

3.2.1 Calcio fosfato amorfo – ACP

Ben più estensivo è l'impiego di composti a base di calcio-fosfato amorfo (amorphous calcium phosphate, ACP) che ha subito un rapido incremento negli ultimi 15 anni.

L'ACP è un insieme di ioni e di piccole molecole, prevalentemente calcio e fosfato, che appaiono disorganizzate (amorfe, appunto) e non strutturate in complessi cristallini ordinati, come quelli tipici dell'idrossiapatite. L'ACP è considerato un precursore dell'idrossiapatite ed è rilevabile nelle prime fasi di formazione di ossa e strutture dentarie, dopo le quali tende a organizzarsi in strutture cristalline dando il via alla formazione dell'idrossiapatite stessa. L'ACP, quindi, rappresenta uno stadio molto reattivo della cristallogenesi e, grazie alle sue piccole dimensioni, è anche particolarmente indicato per la remineralizzazione delle lesioni di smalto e dentina nell'ambito microstrutturale.

Il rovescio della medaglia è che l'ACP, essendo molto reattivo, in presenza di acqua tende a precipitare e a dare luogo alla formazione di cristalli più grossi, meno reattivi e meno idonei a una rigenerazione dello smalto e della dentina (Fig.29; per questo motivo, l'ACP deve essere contenuto in una sostanza carrier che lo isoli dall'acqua e lo mantenga stabile, ma che

sia in grado di rilasciarlo velocemente quando raggiunge la superficie dentaria.

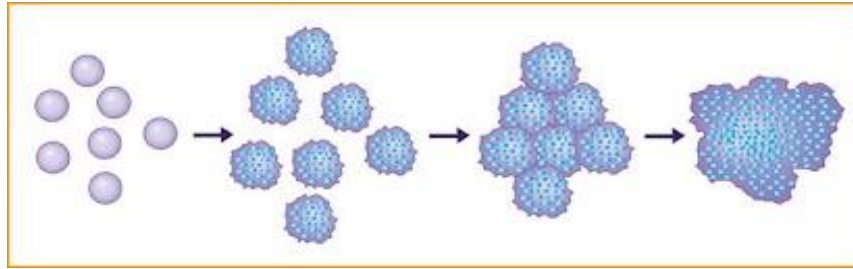


Fig. 29: Trasformazione dell'ACP (a sinistra) in cristalli strutturati più voluminosi. L'aggregazione in cristalli dell'ACP contenuto nei prodotti remineralizzanti avviene rapidamente dopo il contatto con un ambiente acquoso come la saliva. Per questo i prodotti che lo contengono sono privi di acqua (anidri).

Il carrier più noto in letteratura è un derivato della caseina del latte che genera così il composto CPP-ACP (casein phosphopeptide/ amorphous calcium phosphate), che ha mostrato attività antiplacca e un effetto anticarie; infatti è stato dimostrato che CPP-ACP riduce la demineralizzazione dello smalto e promuove la remineralizzazione dei tessuti duri attraverso un meccanismo di tamponamento offerto dagli ioni calcio e fosfato unitamente all'incorporazione di ACP nella placca batterica e sulla superficie del dente, mantenendo uno stato di sovrasaturazione rispetto a smalto e dentina, remineralizzandoli.

Il principale problema di CPP-ACP è legato al fatto che la caseina è una proteina di origine animale, e pertanto è un potenziale allergene. L'uso del prodotto non è infatti indicato in tutti i soggetti allergici alle proteine del latte.

Il composto CPP-ACP, essendo uno dei più studiati per la remineralizzazione/rigenerazione dei cristalli di idrossiapatite del dente, ha mostrato capacità di riduzione delle lesioni demineralizzate come white spot e di prevenzione delle lesioni cariose. I protocolli di utilizzo indicati per CPP-ACP in caso di trattamento di lesioni demineralizzate prevedono di utiliz-

zare il prodotto per almeno 30 giorni, quindi di rivalutare la lesione da trattare ed eventualmente prolungare il trattamento fino a che la lesione non mostri maggiori cambiamenti apprezzabili. Non è necessario trattare la lesione prima di esporla a CPP-ACP: l'uso di acido ortofosforico o sostanze alcaline è piuttosto comune, poiché si pensa che possa rendere le aree da trattare più permeabili al principio attivo e quindi più suscettibili di rigenerazione ma, tuttavia, mancano ancora prove che dimostrino un aumento di efficacia indotto da queste manovre di pretrattamento.

Se usato a scopo preventivo, quindi in assenza di lesioni (come nel caso di pazienti sottoposti a trattamento ortodontico), CPP-ACP viene consigliato quotidianamente, sempre per almeno 30 giorni, periodo da ripetersi normalmente dopo le sedute di igiene periodiche, per un utilizzo su superfici prive di depositi di placca e tartaro. Può essere applicato con il dito o con lo spazzolino dopo le manovre di igiene orale quotidiane oppure, se in formulazione di pasta dentifricia o mousse, anche in sostituzione del dentifricio abituale.

Più recentemente, ACP è stato anche associato ad acido citrato per aumentarne l'attività. Tuttavia, la funzionalizzazione con il citrato e l'associazione tra ACP e fluoro (ACP-F) pare essere più idonea nel campo della remineralizzazione piuttosto che in quello preventivo. In questo modo, infatti, il citrato può conferire all'ACP-F caratteristiche di biomimetismo: a livello fisiologico il citrato rappresenta almeno il 5% in peso dei tessuti mineralizzati del corpo e si trova all'interno della matrice cristallina anche negli strati profondi. Inoltre, rende stabile l'ACP-F fintanto che il composto non entra in contatto con la saliva. In ambiente acquoso, il guscio di citrato rilascia rapidamente ACP e fluoro che pertanto diventano altamente biodisponibili e, grazie alla particolare affinità del citrato per le strutture cristalline del dente, aumenta il biomimetismo a livello delle aree

danneggiate e demineralizzate, risultando in un maggiore potenziale remineralizzante. Anche il citrato-ACP è sensibile all'acqua, poiché ACP tenderebbe a cristallizzare e il prodotto si inattiverebbe; pertanto, i prodotti che lo contengono, al pari di CPP-ACP, sono anidri piuttosto densi e richiedono il contatto con la saliva per attivarsi.

Attualmente, ACP rappresenta il principio attivo più studiato per il trattamento delle white spot, e sono numerose le pubblicazioni dove tali lesioni sono state trattate anche con completa restitutio ad integrum. Per poter ottenere dei risultati, secondo i protocolli di Reynolds validi per CPP-ACP, anche per il citrato-ACP-F le applicazioni devono essere ripetute quotidianamente per almeno un mese, per poi rivalutare i risultati e valutare un'eventuale prosecuzione, mantenendo un'igiene ottimale e limitando i fattori demineralizzanti.

Ad oggi moltissimi studi condotti in vitro, tra cui anche i più recenti effettuati da questa università (UNIVPM), hanno dimostrato come l'effetto remineralizzante indotto dal trattamento con CPP-ACP sia superiore rispetto a quello ottenuto con prodotti a base di Fluoro a concentrazione superiore a 1400 ppm.

Nel 2020 un ulteriore studio condotto sempre dal team dell'Università Politecnica delle Marche, e presentato solo recentemente al congresso SIOI 2022 ad Ancona, ha dimostrato come il miglior trattamento remineralizzante fosse l'utilizzo di una mousse di CPP-ACP associata al 0,33% Monofluorofosfato di sodio ($\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$).

3.3 Idrossiapatiti

Le idrossiapatiti possono essere accomunate chimicamente all'ACP precedentemente descritto, ma rispetto a questo esse rappresentano già delle strutture cristalline organizzate e, dal punto di vista dimensionale, molto più grandi. Per questo motivo, esse non sono particolarmente idonee per produrre un effetto remineralizzante, essendo spesso più grandi delle lesioni con cui devono interagire. Inoltre, l'idrossiapatite stechiometrica (ovvero nella sua forma chimica pura, senza sostituzioni di ioni o impurità) è un cristallo piuttosto stabile e poco reattivo. Questo significa che anche qualora entrasse in contatto con un'area di smalto demineralizzata non sarebbe in grado di legarvisi e di rigenerare i cristalli. Per ottenere un'idrossiapatite che possa essere utilizzata a fini remineralizzanti, la struttura cristallina deve essere "manipolata" tramite sostituzioni ioniche ed arricchita con elementi che la possano rendere bioattiva e biomimetica, ovvero in grado di interagire con i tessuti dentari e di comportarsi come l'idrossiapatite nativa.

Esistono numerose possibilità di sostituzioni ioniche nella molecola di idrossiapatite che la rendono più reattiva. Quella più rilevante è l'incorporazione dello ione carbonato (CO_3^{2-}). Il carbonato, una volta incorporato, ha il potere di rendere instabile l'idrossiapatite, ovvero di aumentarne la solubilità in ambiente fisiologico, e renderla in grado di liberare ioni che possano interagire con l'idrossiapatite del dente. Così facendo, il carbonato favorisce un'integrazione degli ioni rilasciati nelle strutture cristalline. Tuttavia, l'idrossiapatite rimane un cristallo piuttosto voluminoso e pertanto, in mancanza di una marcata destabilizzazione offerta dalla quantità di ione carbonato incorporabile, necessita di essere mantenuta a dimensioni di microparticelle se non addirittura nanoparticolata, ovvero ridotta a livello di particelle nanometriche, con tutti i limiti imposti

all'utilizzo che queste dimensioni molecolari hanno nella moderna medicina. La riduzione a particelle nanometriche consente di avere un materiale molto più biodisponibile e il carbonato impedisce una sua aggregazione in cristalli più grossi mantenendolo a dimensioni ideali. Tuttavia, secondo alcuni studi in vitro la nanoidrossiapatite sarebbe comunque in grado di far regredire e riparare le lesioni solo negli strati esterni di smalto e dentina, ma non nelle parti più profonde delle lesioni cariose iniziali, dove tuttavia è presente la maggior parte della perdita di minerali e dove è più rilevante ottenere l'azione remineralizzante.

L'idrossiapatite può essere però sostituita anche da altri ioni oltre al carbonato. In particolare fluoro, zinco, magnesio, stronzio. Al di là del fluoro di cui si è già parlato e dello zinco, che ha funzioni più limitate in ambito antibatterico, il magnesio e lo stronzio possono svolgere un'azione più interessante e sinergica al carbonato per consentire ad un'idrossiapatite multisostituita di essere biomimetica e bioattiva. In particolare, un'idrossiapatite Mg-Sr-CO₃ sostituita è in grado di rilasciare molti più ioni di una carbonato-idrossiapatite e di promuovere diverse funzioni contemporaneamente. Il carbonato infatti destabilizza l'idrossiapatite e libera ioni sulle superfici dentarie. Il magnesio, essendo di piccole dimensioni, penetra nelle aree lesionate dello smalto e della dentina e facilita la nucleazione, ovvero la formazione di nuovi centri di formazione di cristalli di idrossiapatite, che si legano ai cristalli circostanti nativi. Il magnesio, contemporaneamente, rallenta la crescita volumetrica dei cristalli, favorendo la formazione di molteplici nuclei anziché di pochi voluminosi cristalli che finirebbero per inibire i processi di rigenerazione. Lo stronzio, invece, stabilizza i cristalli di idrossiapatite neoformata, avendo un'elevata affinità per i tessuti dentari, e contribuisce alla formazione di una struttura cristallina compatta e resistente. Se è presente anche fluoro apportato in ambiente orale dallo

stesso prodotto o da altre fonti, lo stronzio agisce in maniera sinergica e contribuisce alla formazione dei cristalli di fluoroapatite. Come per la carbonato-idrossiapatite, anche l'idrossiapatite multisostituita necessita di essere mantenuta a dimensioni cristalline ridotte, microstrutturali, pena la perdita della sua bioattività.

Le idrossiapatiti sono meno reattive dell'ACP; pertanto, anche la loro azione è più lenta e richiedono periodi di utilizzo prolungati per garantire il loro effetto remineralizzante e preventivo della carie e della sensibilità. I protocolli di prescrizione prevedono quindi di utilizzare questi prodotti, normalmente in forma di dentifrici e collutori, quotidianamente senza limiti prefissati di tempo. La scelta della tipologia di prodotto e della durata del trattamento deve essere mediata dalla valutazione clinica e dal peso dei fattori di rischio e della sintomatologia.

3.3.1 Chitosano

Il chitosano è un polimero della D-glucosammina, facilmente e velocemente solubilizzato da una soluzione acida per effetto della salicazione dei gruppi aminofunzionali.

La chitina e il chitosano avendo caratteristiche molto interessanti quali la biocompatibilità, la biodegradabilità, l'atossicità, la capacità di prevenire le infezioni e di accelerare il processo di guarigione delle ferite sono stati studiati in letteratura al fine di comprenderne l'effettiva utilità in ambito odontoiatrico. Alcuni studi hanno infatti dimostrato come la coniugazione tra il chitosano a medio-alto peso molecolare e l'idrossiapatite multisostituita con Magnesio e Stronzio possa migliorare di gran lunga le caratteristiche di adesione allo smalto rispetto al semplice utilizzo di idrossiapatite multisostituita.

3.4 Biovetri

I biovetri sono una particolare tipologia di materiali bioattivi costituiti principalmente da calcio, sodio, fosfati e silicati. Essi sono stati impiegati per la prima volta negli anni Sessanta, inventati dal dottor Larry Hench. Sono altamente reattivi quando esposti ai fluidi organici e reagiscono depositando fosfato di calcio sulle superfici. Inoltre, in ambiente acquoso il sodio dei biovetri reagisce con gli ioni H^+ innalzando il pH della soluzione e favorendo, così, il rilascio di ioni calcio e fosfato dal biovetro. Il biovetro dà quindi luogo alla formazione di “silanoli” (Si-OH) e a uno strato superficiale ricco di silice, che richiama nuovamente gli ioni calcio e fosfato che precipitano sulla sua superficie grazie all’innalzamento del pH.

Questa abilità di creare uno strato ricco di silice, calcio e fosfato è stata sfruttata per fare dei biovetri la base di sistemi desensibilizzanti, essendo questi molto abili a occludere i tubuli dentinali inducendo la formazione di materiale simile a un'idrossiapatite, più precisamente di una carbonato-idrossiapatite, chimicamente e strutturalmente molto simile a quella ossea e dentale. Oltre a un effetto desensibilizzante, i fosfosilicati o biovetri hanno mostrato una spiccata attività antibatterica contro specie come *S. mutans* o *S. sanguis*.

Sono invece molto limitati gli studi che abbiano indagato il potere remineralizzante dei biovetri. In alcuni lavori si è visto che la combinazione di un biovetro con dentifrici ad alto contenuto di fluoro (5000 ppm) può portare a un maggior effetto remineralizzante delle white spot, ma se osservate al microscopio le lesioni presentano ancora una perdita della struttura prismatica cristallina tipica dei tessuti dentali, dimostrando che il tessuto è stato riparato ma non propriamente rigenerato.

Un altro studio non ha mostrato una particolare differenza nella prevenzione delle lesioni cariose iniziali tra un dentifricio contenente un biovetro e un comune dentifricio al fluoro durante un trattamento ortodontico. Pertanto, sebbene i biovetri siano altamente efficaci e indicati come desensibilizzanti, e una recente revisione abbia evidenziato come i fosfosilicati possano esibire una capacità di promozione della neoformazione di cristalli di idrossiapatite, sono ancora poche le evidenze sul loro reale potere remineralizzante. Tuttavia, nei soggetti che manifestino una carenza di saliva e conseguentemente di calcio e fosfati, l'utilizzo di prodotti contenenti fosfosilicati può essere particolarmente vantaggioso.



Fig. 30: Paziente con xerostomia. L'assenza di saliva favorisce i processi di demineralizzazione e l'insorgenza di lesioni cariose, anche in siti già trattati con restauri (carie secondarie). In questi casi è idoneo l'utilizzo dei Biovetri.

I protocolli di utilizzo prevedono un uso quotidiano senza limiti temporali, in quanto i biovetri sono disponibili per lo più in forma di dentifrici. Il loro utilizzo può essere preceduto da un trattamento con prodotti professionali con lo stesso principio attivo, ma con concentrazioni più elevate o in forma fruibile dal professionista (per esempio, paste da fluoroprofilassi contenenti fosfosilicati).

3.5 Silicati di calcio

I silicati di calcio, al contrario dei fosfosilicati, hanno mostrato da tempo una particolare abilità nell'indurre una rapida formazione di idrossiapatite e nell'integrarsi con strutture mineralizzate di tessuti ossei viventi. Il loro meccanismo di azione è in parte simile a quello dei fosfosilicati, anche se presentano una più elevata bioattività. Un volta in soluzione acquosa, i silicati di calcio liberano ioni calcio, determinando un innalzamento del pH salivare, la formazione di sali di fosfato di calcio e la successiva deposizione cospicua di idrossiapatite sulla superficie dentale. I silicati di calcio sono stati utilizzati per lungo tempo come materiali endodontici come sigillanti canalari o per il trattamento delle perforazioni e delle esposizioni accidentali della polpa dentaria durante procedure conservative. Inoltre, al pari dei fosfosilicati, i silicati di calcio sono degli ottimi desensibilizzanti. Il loro potere remineralizzante pare essere superiore a quello dei fosfosilicati; diversi studi hanno infatti dimostrato la neoformazione di idrossiapatite e la remineralizzazione di tessuti dentari danneggiati. Secondo uno studio in vitro, la velocità di deposizione di nuovi strati di idrossiapatite dopo trattamento di una lesione demineralizzata con un silicato di calcio raggiunge lo spessore di circa 2 micron già dopo 7 giorni. La formazione di nuova idrossiapatite è stata osservata anche in test che hanno coinvolto l'utilizzo di saliva umana.

I silicati di calcio sono disponibili anche associati a una fonte di fosfati come il trisodio- fosfato in miscela anidra. In questo modo, a contatto con la saliva vi è un aumento della disponibilità di ioni calcio ma anche di ioni fosfato, incrementando la deposizione sulla superficie del dente di idrossiapatite rispetto ai silicati di calcio da soli.

Come per i biovetri, per garantire un effetto i silicati di calcio devono essere utilizzati a domicilio, quotidianamente, per tempi prolungati; sono per questo disponibili in dentifrici, qualcuno anche in forma di siero o mousse bioattiva.

3.6 Peptidi autoassemblanti p11-4

Recenti ricerche nell'ambito della bioingegneria rappresentano nuove frontiere nel campo della remineralizzazione come per esempio la creazione di alcuni peptidi che possiedono la proprietà di autoassemblarsi in un ambiente biologico e costituire delle impalcature (scaffold) attorno alle quali possono originare alcuni processi biologici.

In campo dentale, in alcune particolari condizioni ambientali il peptide p11-4 può organizzarsi in una struttura tridimensionale e determinare la formazione di nuovi cristalli di idrossiapatite (nucleazione) quindi potrebbe essere utilizzato per la rigenerazione dei tessuti mineralizzati del dente, poiché agirebbe mimando l'azione delle proteine di matrice che sono presenti durante lo sviluppo dentale. Alcuni risultati sembrano dimostrare che anche una singola applicazione di p11-4 può essere vantaggiosa nel trattamento delle lesioni cariose iniziali e che i peptidi autoassemblanti possono in futuro diventare i materiali candidati per i processi di remineralizzazione, rigenerazione e riparazione dentaria.

Come precedentemente detto, il meccanismo di azione è determinato da particolari condizioni ambientali, in base alle quali il peptide p11-4 cambia da composto a bassa viscosità a gel di consistenza elastomerica. Solo a questo punto, infatti, i gruppi anionici delle catene laterali attrarrebbero ioni calcio, inducendo la precipitazione dei nuovi cristalli di idrossiapatite in situ.

Il p11-4 è sicuro, non invasivo e facilmente tollerabile da parte dei pazienti. L'uso di questo peptide rappresenta un approccio biomimetico e offre il vantaggio addizionale di una ricostruzione "naturale" attraverso una rigenerazione del minerale stesso. Il p11-4 è in grado di penetrare nelle microporosità formando delle impalcature tridimensionali di proteine e piccole fibrille che supportano la formazione dei nuovi cristalli fino a un periodo di 3 mesi dopo una singola applicazione.

3.7 Arginina

L'arginina è un aminoacido che si trova normalmente anche a livello salivare; esso è largamente utilizzato e noto in ambito odontoiatrico, ed è stato accomunato ai processi di remineralizzazione, anche se in realtà non vanta affatto proprietà remineralizzanti. L'arginina, infatti, è impiegata in numerosi prodotti come agente desensibilizzante, con un'efficacia molto elevata dovuta alle sue particolari proprietà. Infatti, essa viene adsorbita sulla superficie del calcio carbonato e va a formare un complesso carico positivamente che si lega alla dentina che, invece, è carica negativamente a livello delle superfici esposte e all'interno dei tubuli, portando a un effetto desensibilizzante. Quest'associazione tra l'arginina e le strutture dentarie fornisce nell'ambiente orale un pH sufficientemente alcalino per facilitare la deposizione di calcio e fosfato endogeni.

Inoltre, un meccanismo interessante è la sua capacità di neutralizzare gli acidi della placca; infatti, i batteri arginino-litici nella placca metabolizzano l'arginina producendo una sostanza basica che aiuta a neutralizzare gli acidi derivanti invece dalla degradazione dello zucchero, ristabilizzando il pH a un livello fisiologico per il cavo orale. Molto spesso infatti si dice che i prodotti contenenti arginina siano in grado di neutralizzare gli acidi

della placca tuttavia l'arginina non vanta proprietà remineralizzanti e rimane quindi un valido desensibilizzante.

Di conseguenza grazie agli studi condotti in vitro si è dimostrato come essa NON possa essere utilizzata a fine remineralizzante ma solo per contrastare l'ipersensibilità dentinale indotta dal processo demineralizzativo.

3.8 Xilitolo

Lo xilitolo è un polialcole di origine naturale che viene estratto da organismi vegetali quali la betulla, la fragola, la prugna, il grano e il lampone; in odontoiatria è noto da molti anni per le sue proprietà cariostatiche ed antibatteriche, infatti viene assorbito dai batteri come uno zucchero ma, rispetto agli zuccheri fermentabili, i batteri orali, come lo *Streptococcus mutans*, non sono in grado di convertirlo in metaboliti cariogeni come l'acido lattico. Per questo motivo è utilizzato come dolcificante alimentare acariogeno ma anche in numerosi prodotti da igiene orale come dentifrici, colluttori e gomme da masticare.

È stato nel tempo riscontrato che lo xilitolo riduce gli streptococchi *mutans* nella placca e nella saliva e inibisce il legame di questi alla pellicola dello smalto acquisita. Questo fatto a sua volta porta a una placca meno aderente e ad una diminuzione della produzione di acido. Inoltre, masticare la gomma xilitolo stimolerà un aumento del flusso salivare che a sua volta aumenta la quantità di calcio nella saliva e migliora la clearance orale. Un flusso di saliva aggiuntivo che include prodotti da masticare come le gomme che non contengono carboidrati fermentabili può aiutare nella modulazione del pH della placca. Lo xilitolo è un alcol zuccherino che fornisce la sensazione di assaporare la dolcezza negli alimenti, in particolare le gomme da masticare, senza fornire saccarosio che è l'unico zucchero che

S.mutans è in grado di utilizzare per produrre l'adesivo di poliacrilammide che consente loro di legarsi ai denti.

Lo xilitolo non riduce o danneggia attivamente la presenza o le capacità dei batteri orali, ma piuttosto non offre loro il sostentamento per propagarsi o funzionare. Sebbene queste considerazioni non possano invertire alcuna condizione di salute sono per lo più preventive e non favoriscono gli eventi consequenziali come carie dentale, placca eccessiva e condizioni di gengivite. L'efficacia dello xilitolo sulla remineralizzazione, ad oggi, è una certezza tanto che il Ministero della Salute gli ha dedicato un paragrafo nelle "Linee Guida Nazionali per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età evolutiva" del 2013.

***CAPITOLO IV:
CONCLUSIONI***

CONCLUSIONI

I difetti di mineralizzazione dello smalto possono comportare un importante disagio estetico per i pazienti che ne sono affetti, anche quando si presentano in forme lievi e/o moderate. In questi casi un approccio ricostruttivo comporta un costo biologico elevato ed anche il solo uso di sostanze ad azione sbiancante produce generalmente un'esaltazione del difetto, rendendolo ancor più evidente.

I risultati positivi ottenuti dagli ultimi studi riportati in letteratura fanno ben sperare e ipotizzare una sempre più ampia gamma di applicazione dei prodotti remineralizzanti a base di derivati della caseina e fluoro nella correzione dei difetti lievi e moderati dello smalto, seppur con i limiti legati principalmente alla collaborazione attiva che deve offrire il paziente.

Il numero di prodotti che vantano potere remineralizzante, riparativo o rigenerante dei tessuti duri dei denti è cresciuto a dismisura negli ultimi anni ed accanto a principi attivi di sicura efficacia, ve ne sono altri che, pur avendo mostrato una certa azione remineralizzante, sono più indicati per altri ambiti quali, per esempio, il trattamento della sensibilità dentinale e quello delle erosioni dentarie o la prevenzione delle lesioni cariose unitamente alle manovre di igiene orale. È chiaro ormai da molti decenni come il fluoro sia un elemento indispensabile per la prevenzione della carie dentaria; molto più limitato è il suo potere remineralizzante rispetto ad altri principi attivi oggi disponibili.

I sali di calcio e fosfato sono sicuramente più promettenti, potendo agire da fonte di minerali costituenti gli elementi dentari stessi.

Tuttavia, è solo con i materiali bioattivi e biomimetici che si può ottenere una vera e propria remineralizzazione o, spesso, una vera rigenerazione microstrutturale dei tessuti duri del dente. Solo questi, infatti, mostrano

un potenziale sufficiente per poter interagire con le lesioni demineralizzate anche negli strati più profondi, mentre tutti gli altri si limitano a effetti superficiali o a mere riparazioni temporanee. È tuttavia importante conoscere la biochimica dell'ambiente orale per poter approcciare e trattare una lesione demineralizzata. Il pH salivare può raggiungere anche valori molto bassi, all'interno del biofilm batterico orale può arrivare anche a valori prossimi a 4, ovvero molto al di sotto del punto di dissoluzione dell'idrossiapatite. Questo vuol dire che anche un buon principio remineralizzante non può essere efficace se la reazione è fortemente sbilanciata verso la demineralizzazione. Inoltre, molti prodotti remineralizzanti richiedono delle applicazioni ripetute, spesso domiciliari.

Se sulle superfici dentarie è presente uno strato di biofilm consistente, o peggio ancora tartaro, non vi può essere alcuna reazione remineralizzante, e pertanto il trattamento è destinato comunque a fallire.

Infine, al di là del principio attivo utilizzato solo l'intervento dei processi biologici che normalmente avvengono all'interno del cavo orale può portare qualsiasi prodotto a trovare l'ambiente ideale per funzionare. Questi includono i meccanismi che regolano il pH, l'attivazione di enzimi e proteine salivari e l'influenza dei fattori protettivi offerti dal sistema immunitario.

Quanto all'impiego di strutture nanometriche, sebbene abbiano mostrato un livello di efficacia incoraggiante nel campo della remineralizzazione, delle investigazioni chiare sul rapporto tra i loro benefici e i potenziali rischi per la salute e per l'ambiente, se esistenti, dovrebbero essere condotte in maniera esaustiva.

È quindi fondamentale capire quando un trattamento remineralizzante deve essere utilizzato, conoscere a fondo i meccanismi biologici che regolano l'equilibrio fra demineralizzazione acida e remineralizzazione, capire i

meccanismi biochimici per cui un principio attivo contenuto in un prodotto che si va ad utilizzare, identificare i fattori di rischio che potrebbero ridurre l'efficacia del trattamento e rimuovere, se possibile, eventuali ostacoli al corretto funzionamento della terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Dis* 2007;2:17.
2. Ng FK, Messer LB. Dental management of amelogenesis imperfecta patients: a primer on genotype-phenotype correlations. *Pediatr Dent* 2009;31:20-30.
3. Lygidakis NA. Treatment modalities in children with teeth affected by molar-incisor enamel hypomineralisation (MIH): A systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010;11:65-74.
4. Lygidakis NA, Wong F, Jälevik B, Vierrou AM, Alaluusua S, Espelid I. Best Clinical Practice Guidance for clinicians dealing with children presenting with Molar-Incisor-Hypomineralisation (MIH): An EAPD Policy Document. *Eur Arch Paed Dent* 2010;11:75-81.
5. FDI Commission on Oral Health Research and Epidemiology. A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). Commission on Oral Health, Research & Epidemiology. Report of an FDI Working Group. *Int Dent J* 1992;42:411-26.
6. Baroni C, Marchionni S. MIH Supplementation Strategies: Prospective Clinical and Laboratory Trial. *JDR* 2011;90:371-6.

7. Jälevik B. *Prevalence and Diagnosis of Molar-Incisor-Hypomineralisation (MIH). A systematic review. Eur Arch Paediatr Dent 2010;10:59-64.*
8. Li Y. *Safety controversies in tooth bleaching. Dent Clin North Am 2011;55:255-63.*
9. Burrows S. *A review of the safety of tooth bleaching. Dent Update 2009;36:604-6, 608-10, 612-4.*
10. Benbachir N, Ardu S, Krejci I. *Indications and limits of the microabrasion technique. Quintessence Int 2007;38:811-5.*
11. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. *New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. J Dent Res 2010;89:1187-97.*
12. Yengopal V, Mickenautsch S. *Caries preventive effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP): a meta-analysis. Acta Odontol Scan 2009;67:321-32.*
13. Borges BC, Borges JS, de Melo CD, Pinheiro IV, Santos AJ, Braz R, Montes MA. *Efficacy of a novel at-home bleaching technique with carbamide peroxides modified by CPP-ACP and its effect on the microhardness of bleached enamel. Oper Dent 2011;36:521-8.*
14. Borges BC, de Vasconcelos AA, Cunha AG, Pinheiro FH, Machado CT, dos Santos AJ. *Preliminary clinical reports of a novel night-guard tooth*

bleaching technique modified by casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CCP-ACP). Eur J Esthet Dent 2011;6:446-53.

15. Singh RD, Ram SM, Shetty O, Chand P, Yadav R. Efficacy of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to prevent stain absorption on freshly bleached enamel: An in vitro study. *J Conserv Dent 2010;13:76-9.*

16. Kellerhoff NM, Lussi A. Molar-incisor hypomineralization. *Schweiz Monatsschr Zahnmed 2004;114:243-53.*

17. Sheiham A. Impact of dental treatment on the incidence of dental caries in children and adults. *Community Dent Oral Epidemiol 1997;25:104-12.*

18. Yang B, Chen J, Yu Q, Li H, Lin M, Mustapha A, Hong L, Wang Y. Oral bacterial deactivation using a low-temperature atmospheric argon plasma brush. *J Dent 2011; 39: 48-56.*

19. El-Wassefy NA, Remineralizing effect of cold plasma and/or bioglass on demineralized enamel, *Dent Mater J. 2017 Mar 31;36(2):157-167.*

20. <https://www.ildentistamoderno.com/trattamento-dei-difetti-dello-smalto-attraverso-luso-combinato-di-derivati-della-caseina-e-agenti-sbiancanti-2/>

21. <https://regeneratenr5.it/pages/a-proposito-di-regener->

ate.gclid=Cj0KCQiAwf39BRCCARIsALXWETzGs6uhoby5g_MK8134oZvk
JqqNYO5Dh--KttpBG7Y4fwdHY8ZdXZoaAq4PEALw_wcB

22. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571296000838>

23. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571296000838>

24. *ibmc.up.pt. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics 2004*

25. Dan, P., Sundararajan, V., Ganeshkumar, H., Gnanabarathi, B., Subramanian, A. K., Venkatasubu, G. D.,... Mohideen, S. S. (2019). *Valutazione delle nanoparticelle di idrossiapatite – tossicità in vivo indotta in Drosophila melanogaster. Applied Surface Science, 484, 568-577. doi: 10.1016 / j.apsusc.2019.04.120*

26. Seyedmajidi, S., Rajabnia, R., e Seyedmajidi, M. (2018). *Valutazione delle proprietà antibatteriche delle schiume di nanocomposito di vetro idrossiapatite / vetro bioattivo e fluorapatite / vetro bioattivo come impalcatura cellulare del tessuto osseo. Journal of Laboratory Physicians, 10 (03), 265–270. doi: 10.4103 / jlp.jlp_167_17*

27. Zhang, Y., Xu, H. H. K., Takagi, S., & Chow, L. C. (2006). *Impalcatura a base di idrossiapatite indurente in situ per riparazione ossea. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 17 (5), 437–445. doi: 10.1007 / s10856-006-8471-z*

28. Petit, R. (1999). *L'uso dell'idrossiapatite nella chirurgia ortopedica: una revisione decennale. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 9 (2), 71–74. doi: 10.1007 / bf01695730
29. Pepla, E. (2014). *Nano-idrossiapatite e sue applicazioni in odontoiatria preventiva, riparativa e rigenerativa: una revisione della letteratura. Annali Di Stomatologia*. doi: 10.11138 / ads / 2014.5.3.108
30. Dabanoglu A, A. (2009). *Effetto sbiancante e valutazione morfologica dei materiali idrossiapatiti. American Journal of Dentistry*.
31. Nasr-Esfahani, M., & Fekri, S. (2012). *Filtri compositi a nanostruttura di interfaccia allumina / TiO₂ / idrossiapatite come fotocatalizzatori efficienti per la purificazione dell'aria. Cinetica di reazione, meccanismi e catalisi*, 107 (1), 89-103. s11144-012-0457-x
32. Pandi, K., & Viswanathan, N. (2014). *Sintesi del composito nano-idrossiapatite bioincapsulato alginato per l'assorbimento selettivo del fluoruro. Polimeri di carboidrati*, 112, 662-667. doi: 10.1016 / j.carbpol.2014.06.029
33. <https://it.dental-tribune.com/news/i-ricercatori-acquisiscono-nuove-informazioni-sulla-mineralizzazione-dello-smalto-dei-denti/>
34. "Revealing nanoscale mineralization pathways of hydroxyapatite using in situ liquid cell transmission electron microscopy" *American Journal of Dentistry*.

35. <https://advances.sciencemag.org/content/6/47/eaaz7524>
36. Weinand C, Pomerantseva I, Neville CM, Gupta R, Weinberg E, Madisch I, Shapiro F, Abukawa H, Troulis MJ, Vacanti JP. Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone*. Apr;38(4):555-563, 2006.
37. Burg KJL, Porter S, Kellam J: Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2000.
38.
http://www.operativedentistryturin.com/uploads/1/2/8/3/12832575/the_oral_microflora_and_biofilm
39. <https://www.drfedericopalermo.it/microbiota-orale>
40. A microbiological study of normal flora of macropod dental plaque, in *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, vol. 73, n. 2, giugno 2009, pp. 310–47,
41. Verstraelen H, Swidinski A., *The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment.*, in *Current Opinion in Infectious Diseases*, № 26/ 2013 p. 86-89..
42. Davies (2003), *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 114-122

43. *Mol Cell Biochem.* 2010- Epub 2010 May 18: "Contribution of *rpoS* and *bolA* genes in biofilm formation in *Escherichia coli*". K-12 MG1655. Adnan M, Morton G, Singh J, Hadi, School of Forensic and Investigative Sciences, University of Central Lancashire
44. Miller M.B., Bassler B.L. "QUORUM SENSING IN BACTERIA" *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. 55:165-199.
45. Bassier B.L. *Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria.* *Cell.* 2002. Vol. 109, 421–424.
46. <http://www.instructables.com/id/Glowing-Bacteria-Ceparium>
47. *Study of Protonic Mobility in CaHPO₄·2H₂O (Brushite) and CaHPO₄(Monetite) by Infrared Spectroscopy and Neutron Scattering*
48. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022459697973837>
49. S. Mann, "Biomimetic Materials Chemistry", VCH Publ., Weinheim, 1996
50. J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*; Elsevier Sci.; The Neitherlands, 1994.
51. L. Ambrosio, G. Peluso, *Progettazione, caratterizzazione chimico-fisica e biologica dei Biomateriali, VII Congresso Nazionale di Chirurgia Maxillo-facciale, Monduzzi Editore, Ischia 28- 31 Maggio 1991, 3, 957-951*

52. <https://www.studiodentisticoantonini.com/cura-delle-lesioni-dello-smalto-white-e-brown-spots/>
53. *Protocolli clinici a confronto nel trattamento della “White Spot” (Dental Tribune)*
54. *Marco Pasero, Kampf Anthony R., Ferraris Cristiano, Pekov Igor V., Rakovan John, White Timothy J., Nomenclature of the apatite supergroup minerals (PDF), in European Journal of Mineralogy, vol. 22, marzo 2010, pp. 163-179, DOI:10.1127/0935-1221/2010/0022-2022.*
55. Dott. Lorenzo Paolo Bottini:
https://www.youtube.com/watch?v=aY6FPFxaw_g
56. <http://studiodentisticofazialbo.it/2020/01/21/approfondimenti/erosione-dentale>
57. <https://www.studiogellini.com/erosione-dentale-e-invecchiamento-precoce-dei-denti-un-fenomeno-che-conosciamo-e-che-possiamo-risolvere/>
58. *Larson R.H. Fitzgerald R.J. “Caries development in rats of different ages with controlled flora.” Arch Oral Biol. Nov–Dec 1964; 9: 705 (The Journal of American Dental Association)*

59. Sognaes R.F. "Introduction to the problems of dental caries. In Whipple, H.E. (ed.). *Mechanisms of dental caries.*" *Ann NY Acad Sci.* Sept 1965; 131: 687 (*The Journal of American Dental Association*)
60. Kleinberg I. Jenkins G.N. "The pH of dental plaques in the different areas of the mouth before and after meals and their relationship to the pH and rate of flow of resting saliva." *Arch Oral Biol.* Sept–Oct 1964; **9**: 493 (*The Journal of American Dental Association*)
62. "Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci" B Guggenheim, H E Schroeder PMID: 6056776
61. Champion GL, Richter JE. Atypical presentation of gastroesophageal reflux disease: chest pain, pulmonary, and ear, nose, throat manifestations. *Gastroenterologist* 1993 1(1): 18-33.
62. Chandra A, Moazzez R, Bartlett D, Anggiansah A, Owen WJ. A review of the atypical manifestations of gastroesophageal reflux disease. *Int J Clin Pract* 2004, 58(1): 41-48.
63. Al-Malik MI, Holt RD, Bedi R, Speight PM Investigation of an index to measure tooth wear in primary teeth. *J Dent* 2001; 29: 103-107.
64. Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent* 2004; 32: 591–602.
65. Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci* 2006; 20: 119-139.

66. Ganss C, Lussi A, Klimek J. Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries research* 2005; 39(3): 178- 184.
67. Grenby TH. Methods of assessing erosion and erosive potential. *Eur J Oral Sci* 1996; 104(2): 207-214.
68. Hove LH, Young A, Tveit AB. An in vitro study on the effect of TiF4 treatment against erosion by hydrochloric acid on pellicle-covered enamel. *Caries Res* 2007;41:80–84.
69. Joshi M, Joshi N, Kathariya R, Angadi P, Raikar S. Techniques to Evaluate Dental Erosion: A Systematic Review of Literature. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(10):ZE01-ZE07.
70. O'Sullivan EA, Curzon ME. A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *ASDC J Dent Child* 2000;67(3):186-92.
71. Ribeiro CC, Gibson I, Barbosa MA. The uptake of titanium ions by hydroxyapatite particles structural changes and possible mechanisms. *Biomaterials* 2006;27:1749–61.
72. Vandenplas Y, et al. Pediatric gastroesophageal reflux clinical practice guidelines: joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology , Hepatology, and Nutrition (NASPGHAN) and the European Society for Pediatric Gastroenter-

ology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49(4): 498-547.

73. Zipkin I, McClure FJ. Salivary citrate and dental erosion; procedure for determining citric acid in saliva; dental erosion and citric acid in saliva. *J Dent Res.* 1949; 28(6):613-26.

74. Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1: 245-53.

75. Almeida e Silva JS, Baratieri LN, Araujo E, Widmer N. Dental erosion: understanding this pervasive condition. *J Esthet Restor Dent.* 2011 Aug;23(4):205-16. doi: 10.1111/j.1708-8240.2011.00451.x. Epub 2011 Jun 22. PMID: 21806751.

76. 9696. Meurman JH, ten Cate J. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(Pt 2):199–206. [[PubMed](#)]

77. Habelitz S. Materials engineering by ameloblasts. *J Dent Res.* 2015;94(6):759–767 Rios D, Honório HM, Francisconi LF, Magalhães AC, de Andrade Moreira Machado MA, Buzalaf MAR. In situ effect of an erosive challenge on different restorative materials and on enamel adjacent to these materials. *J Dent.*

78. Abou Neel EA, Bozec L, Perez RA, Kim HW, Knowles JC. Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:6371-6394. Published 2015 Oct 8. doi:10.2147/IJN.S86033

79. *Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. Int J Nanomedicine. 2016;11:4743-4763. Published 2016 Sep 19. doi:10.2147/IJN.S107624*
80. *Siddiqui S, Anderson P, Al-Jawad M (2014) Recovery of Crystallographic Texture in Remineralized Dental Enamel. PLoS ONE 9(10): e108879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108879>*
81. *Weir MD, Chow LC, Xu HH. Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. J Dent Res. 2012 Oct;91(10):979-84. doi: 10.1177/0022034512458288. Epub 2012 Aug 29. PMID: 22933607; PMCID: PMC3446834.*
82. *Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliaiu G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. Ann Stomatol (Roma). 2014;5(3):108-114. Published 2014 Nov 20.*
83. *Tosco, Vincenzo & Monterubbianesi, Riccardo & Sparabombe, Scilla & Orilisi, Giulia & Putignano, Angelo & Orsini, Giovanna. (2020). In Vitro Investigation of the Effect of Different Remineralizing Agents on Human Enamel. Modern Approaches in Dentistry and Oral Health Care. 4. 10.32474/MADOHC.2020.04.000189.*