



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in  
Scienze delle Professioni Sanitarie Tecniche Assistenziali

**Ruolo degli esosomi dello zenzero nella  
modulazione del microbiota orale:  
proposta di un protocollo di ricerca**

Relatore: Chiar.ma  
**Prof.ssa Giovanna Orsini**

Tesi di Laurea di:  
**Silvia Coacci**

Correlatori: Chiar.me  
**Dott.ssa Fabia Profili**  
**Dott.ssa Giulia Orilisi**

A.A. 2020/2021

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUZIONE.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>CAPITOLO 1.</b>   |           |
| <b>GLI ESOSOMI.....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1. Definizione, biogenesi e struttura.....                       | 5         |
| 1.2. Esosomi isolati da alimenti vegetali.....                     | 6         |
| 1.2.1. Isolamento della nanovesicole vegetali.....                 | 7         |
| 1.2.2. Proprietà fisiche delle nanovesicole vegetali.....          | 8         |
| 1.2.3. Proprietà chimiche delle nanovesicole vegetali.....         | 9         |
| <b>CAPITOLO 2.</b>   |           |
| <b>APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEGLI ESOSOMI VEGETALI.....</b>       | <b>12</b> |
| 2.1. Proprietà antinfiammatorie.....                               | 12        |
| 2.2. Proprietà rigenerative e di rimodellamento.....               | 14        |
| 2.3. Proprietà di modulazione del microbiota commensale.....       | 15        |
| 2.4. Proprietà antitumorali.....                                   | 16        |
| 2.5. Utilizzo come vettori per la somministrazione di farmaci..... | 19        |
| <b>CAPITOLO 3.</b>   |           |
| <b>IL MICROBIOTA ORALE.....</b>                                    | <b>23</b> |
| 3.1. Composizione del microbiota orale.....                        | 23        |
| 3.1.1. Batteri.....  | 23        |
| 3.1.2. Funghi.....   | 24        |
| 3.1.3. Archei.....   | 24        |
| 3.1.4. Virus.....  | 24        |
| 3.2. Localizzazione del microbiota orale.....                      | 25        |
| 3.2.1. Saliva.....   | 25        |
| 3.2.2. Superficie dei tessuti molli.....                           | 26        |
| 3.2.3. Superficie dei tessuti duri.....                            | 26        |

|  |    |
|--|----|
| 3.3. Successione ecologica nella formazione del biofilm..... | 28 |
| 3.4. Struttura del biofilm.....                              | 29 |
| 3.5. Cambiamenti microbiologici età-correlati.....           | 30 |
| 3.6. Microbiota orale e patologie.....                       | 32 |
| 3.6.1. Carie dentale.....                                    | 32 |
| 3.6.2. Malattia parodontale.....                             | 33 |
| 3.6.2.1. Nuova classificazione parodontale.....              | 34 |
| 3.6.2.2. Valutazione clinica della malattia parodontale..... | 37 |
| 3.6.3. Stomatite aftosa ricorrente.....                      | 40 |
| 3.6.4. Carcinoma orale.....                                  | 40 |
| 3.6.5. Diabete.....  | 41 |
| 3.6.6. Malattie cardiovascolari.....                         | 42 |
| 3.7. Modulazione del microbiota orale.....                   | 43 |
| 3.7.1. Rimozione meccanica.....                              | 44 |
| 3.7.2. Utilizzo di antibiotici.....                          | 44 |
| 3.7.3. Probiotici e prebiotici.....                          | 45 |

## **CAPITOLO 4.**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>PROTOCOLLO DI RICERCA.....</b>                | <b>48</b> |
| 4.1. Introduzione e rationale.....               | 48        |
| 4.2. Titolo dello studio.....                    | 50        |
| 4.3. Obiettivi dello studio.....                 | 50        |
| 4.4. Disegno dello studio.....                   | 50        |
| 4.5. Selezione del campione.....                 | 51        |
| 4.6. Trattamento.....                            | 52        |
| 4.7. Valutazione salivare.....                   | 52        |
| 4.8. Valutazione del microbiota parodontale..... | 53        |
| 4.9. Conclusioni.....                            | 53        |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                         | <b>54</b> |

## INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio il numero di studi relativi alle vescicole extracellulari note come esosomi è cresciuto notevolmente, in particolare da quando è stato dimostrato il loro ruolo chiave nella comunicazione intercellulare. Gli esosomi, in quanto trasportatori di diverse molecole bioattive tra cui proteine, lipidi, RNA, miRNA e DNA, possono prendere parte a diversi meccanismi fisiologici trasferendo il loro contenuto alle cellule riceventi, fungendo così da messaggeri extracellulari nella comunicazione tra cellule, ma stanno richiamando attenzione anche come potenziali strumenti terapeutici.

In questo contesto, le vescicole esosomiali isolate dagli alimenti stanno attirando un crescente interesse grazie alla loro rilevanza nella modulazione dei processi cellulari (fisiologici e patologici), nonché per i loro potenziali effetti benefici sull'organismo, specialmente antinfiammatori, antitumorali, nella rigenerazione tissutale e nella modulazione del microbiota commensale. Si ipotizza, inoltre, di utilizzarle anche come trasportatori di molecole attive, così da sfruttarle per migliorare l'assorbimento e l'efficacia dei farmaci grazie alla loro bassa immunogenicità e all'elevata stabilità nel tratto gastrointestinale.

In particolar modo, data la carenza di studi in letteratura che abbiano indagato se gli esosomi derivati da alimenti possano intervenire anche nella modulazione del microbiota orale, oltre che in quello intestinale, questo lavoro ha lo scopo di proporre un protocollo di ricerca che valuti proprio se si possa evidenziare il ruolo, in tale contesto, di una particolare categoria di nanovesicole esosomiali, quelle derivanti dallo zenzero.

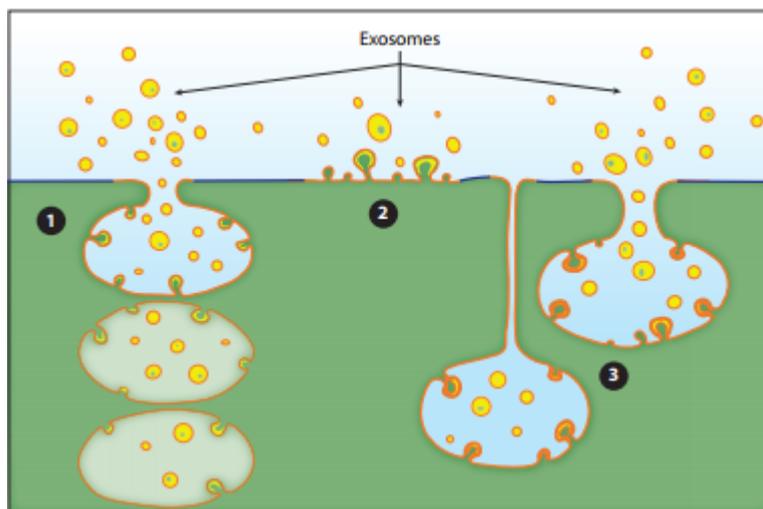
# CAPITOLO 1.

## GLI ESOSOMI

### 1.1. Definizione, biogenesi e struttura

Gli **esosomi** sono piccoli organelli membranosi con un diametro di circa 30–200 nm secreti dalla via endosomiale delle cellule eucariotiche. Essi possono originare ed essere rilasciati nell'ambiente extracellulare attraverso tre modalità:

- 1) Gemmazione delle vescicole in endosomi che maturano in corpi multivescicolari, i quali rilasciano esosomi al momento della fusione della membrana plasmatica;
- 2) Rilascio immediato per gemmazione diretta delle vescicole dalla membrana plasmatica;
- 3) Rilascio ritardato per gemmazione in compartimenti intracellulari collegati alla membrana plasmatica<sup>[1]</sup>.



**Figura 1.** Biogenesi degli esosomi: possibili meccanismi<sup>[1]</sup>.

Una grande varietà di cellule, tra cui quelle immunitarie ed epiteliali, piastrine, cellule dendritiche, mastociti e anche cellule tumorali, hanno la capacità di rilasciare esosomi. Inoltre, la loro presenza è stata riscontrata anche in alcuni fluidi fisiologici, come siero, urina, latte materno, saliva e versamenti maligni<sup>[2]</sup>.

Gli esosomi sono costituiti da una membrana a doppio strato fosfolipidico a cui si associano elementi di natura proteica. Al loro interno possono contenere sia componenti citosolici come mRNA e miRNA sia proteine. Una volta prodotti dalla cellula originaria, essi possono attaccarsi o fondersi con la membrana di una cellula bersaglio, trasferendole così le proprie proteine di superficie e i componenti citosolici<sup>[1]</sup>. In particolare, miRNA, proteine e metaboliti mantengono la loro attività biologica nelle cellule riceventi e possono in tal modo influenzarne le proprietà, influenzando su diverse funzioni fisiologiche e patologiche. Infine, gli esosomi possono anche essere direttamente internalizzati dalla cellula ricevente mediante endocitosi, permettendo loro di fungere da messaggeri extracellulari<sup>[3]</sup>. È stato inoltre dimostrato come gli esosomi partecipino alla comunicazione tra cellule trasferendo il proprio contenuto bioattivo a cellule lontane, e regolino i livelli di espressione di geni e proteine nelle cellule riceventi.

Le vescicole esosomali sono state identificate utilizzando marcatori proteici esosomali come CD63, CD9, CD81 e Hsp70; possono essere isolate da mezzi di coltura cellulare o da fluidi corporei mediante centrifugazione differenziale, filtrazione più centrifugazione, cromatografia di affinità o di esclusione molecolare, precipitazione e tecnologie microfluidiche<sup>[2]</sup>. Ciascun metodo ha i suoi vantaggi e svantaggi, richiede diverse fasi di pre-elaborazione del campione e produce preparati di esosomi di varia purezza e qualità.

## **1.2. Esosomi isolati da alimenti vegetali**

Già nel 1973 uno studio aveva dimostrato la presenza di vescicole esosomali nel latte vaccino scremato, isolate mediante centrifugazione differenziale<sup>[4]</sup>. Successivamente, diversi studi hanno riscontrato la presenza di esosomi nel latte vaccino crudo, parzialmente scremato e totalmente scremato<sup>[5-7]</sup>.

In seguito alla scoperta degli esosomi nelle cellule animali, crescenti evidenze supportano la presenza di **vescicole simili ad esosomi nelle piante**. Queste scoperte sono il risultato di numerose indagini, incentrate principalmente sulla crescita, sulla differenziazione cellulare e sulle risposte delle piante contro una vasta gamma di stress<sup>[8]</sup>. In questo contesto, tali nanovesicole sembrano essersi evolute originariamente sia come mezzo di comunicazione

tra le cellule della pianta stessa, sia come mezzo per modulare la risposta immunitaria innata contro l'invasione dei diversi agenti patogeni<sup>[9]</sup>.

### **1.2.1. Isolamento delle nanovesicole vegetali**

L'isolamento delle nanovesicole vegetali si basa principalmente sulla centrifugazione differenziale e centrifugazione in gradiente di densità.

Le piante vengono ridotte in succo in un mixer, utilizzando poi centrifugazioni a bassa velocità per rimuovere i detriti e gli aggregati vegetali di grandi dimensioni, e successivamente l'ultracentrifugazione per raccogliere le nanovesicole. Un "protocollo standard" per l'isolamento utilizza più fasi di centrifugazione (bassa, media e alta velocità). In generale, la quantità di materia prima (pianta o frutto) utilizzata per isolare le nanovesicole è variabile, da 2–10 g<sup>[10]</sup> a 250 g<sup>[11]</sup>. Inizialmente le cellule intatte vengono rimosse mediante centrifugazione a bassa velocità (ad es. 1.000x g). Il surnatante viene quindi sottoposto a forze centrifughe nell'intervallo di 10.000–20.000x g per rimuovere grandi detriti e organelli intatti. Infine viene sottoposto a centrifugazione ad alta velocità (100.000–150.000x g).

Sebbene la metodologia indicata sia relativamente semplice, il tipo, la quantità e la qualità delle nanovesicole isolate in seguito ad ultracentrifugazione sono altamente sensibili a una serie di parametri, tra cui la forza g, il tipo di rotore (ad angolo fisso o a braccio oscillante), l'angolo di sedimentazione del rotore, il raggio della forza centrifuga e la viscosità della soluzione<sup>[12]</sup>. Inoltre, la massima velocità utilizzata (100.000x g o superiore) sedimenta anche altre vescicole, proteine e/o aggregati di proteine/RNA.

Lo step successivo è l'ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio, utilizzata per separare le nanovesicole dai contaminanti di densità diverse. Essa richiede un tempo di centrifugazione prolungato (1–5 ore), ma fornisce un isolato di nanoparticelle vegetali più purificato rispetto alla sola ultracentrifugazione<sup>[13]</sup>. Al fine di ottenere preparazioni più pure, sono stati implementati altri metodi per gli esosomi di derivazione animale, come l'ultrafiltrazione e l'immunoisolamento<sup>[13]</sup>, ma hanno alcuni svantaggi, tra cui costi più elevati, e non sono stati valutati per la purificazione di quelli di origine vegetale.

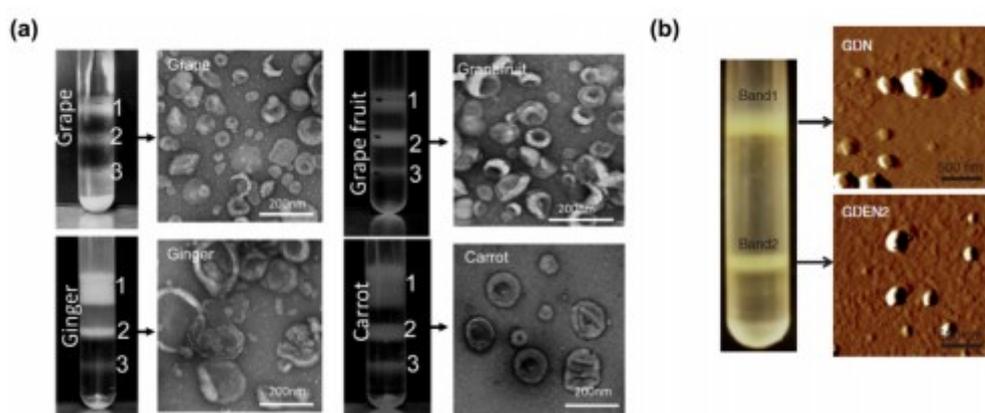
La resa è variabile a seconda della fonte vegetale e del metodo utilizzato per la quantificazione. Zhang et al., ad esempio, hanno riportato un'alta resa di vescicole simili ad

esosomi di  $48,5 \pm 4,8$  mg per 1 kg di zenzero<sup>[14]</sup>. In un altro studio, le rese di produzione erano molto simili tra i frutti e le piante commestibili derivate da radici, con la produzione di circa 350–450 mg di nanoparticelle per 100 g di materiale vegetale<sup>[9]</sup>.

### 1.2.2. Proprietà fisiche delle nanovesicole vegetali

La **dimensione** delle nanovesicole varia da 30 a 1.000 nm; in generale esse presentano un valore negativo di potenziale zeta che va da  $-100$  a circa  $0$  mV, evidenziando la loro repulsione reciproca e la mancata tendenza all'aggregazione<sup>[9]</sup>.

In uno dei primi studi, le nanovesicole di uva, pompelmo, zenzero e carota sono state caratterizzate sulla base della stima al microscopio elettronico dopo centrifugazione in gradiente di saccarosio (Figura 2a) e altre determinazioni<sup>[9]</sup>. Mediante la medesima tecnica, nello studio degli esosomi isolati da radici di zenzero sono state identificate due bande; la distribuzione media delle dimensioni era di circa 292,5 nm per la banda 1 e 232 nm per la banda 2. Il valore del potenziale zeta rilevato a pH 6 (pH del duodeno-digiuno) era  $-12$  mV sia per la banda 1 che per la banda 2<sup>[19]</sup>. La microscopia a forza atomica ha rivelato che gli esosomi dello zenzero sono nanoparticelle sferiche (Figura 2b), mostrano un diametro di circa 130 nm mediante diffusione dinamica della luce, di 120–150 nm mediante microscopia elettronica a scansione e di 294–386 nm con il sistema del gradiente di densità del saccarosio e un valore di potenziale zeta di  $-25$  mV<sup>[24]</sup>.



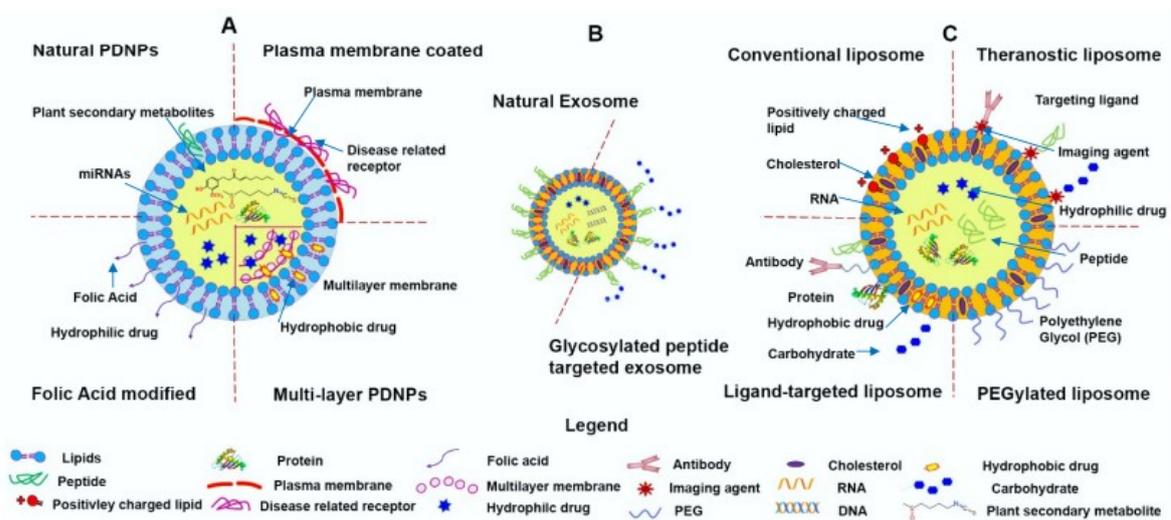
**Figura 2.** Proprietà fisiche delle nanovesicole derivate da uva, pompelmo, zenzero e carota a seguito di centrifugazione in gradiente di saccarosio (a) e identificazione di due bande nello studio degli esosomi isolati da radici di zenzero (b)<sup>[12]</sup>.

La distribuzione delle dimensioni delle nanovesicole derivate dai broccoli, invece, studiata tramite microscopia elettronica, variava da circa 18 a 118 nm. Il potenziale zeta mostrava un valore negativo approssimativamente da  $-9$  a  $-2,6$  mV<sup>[25]</sup>, fornendo le forze repulsive necessarie affinché le particelle rimanessero stabili in soluzione.

In un altro studio sono state isolate nanoparticelle derivate dal limone tramite centrifugazione differenziale e si sono osservate delle vescicole di forma rotonda o a forma di coppa tramite microscopia elettronica a trasmissione, con diametro compreso tra 30 e 100 nm<sup>[26]</sup>. La maggior parte delle nanovesicole vegetali ha una struttura semplice a doppio strato fosfolipidico, simile a quella della membrana cellulare eucariotica, e presenta una forma sferica<sup>[20]</sup>.

### 1.2.3. Proprietà chimiche delle nanovesicole vegetali

I **lipidi** rappresentano i componenti chiave della struttura a doppio strato fosfolipidico delle nanoparticelle vegetali, che hanno una composizione diversa rispetto agli esosomi derivati da cellule mammifere e dai liposomi sintetizzati artificialmente<sup>[15-16]</sup>. È stato osservato che le due classi principali di lipidi presenti sono i fosfolipidi e i glicolipidi, mentre è assente il colesterolo<sup>[17]</sup>.



**Figura 3.** Confronto tra la struttura delle nanoparticelle di origine vegetale (A), degli esosomi di origine animale (B) e dei liposomi artificiali (C)<sup>[17]</sup>.

Infatti, Ju et al., utilizzando un microscopio elettronico, hanno identificato delle nanoparticelle simili ad esosomi nell'uva costituite per il 98% da fosfolipidi, tra i quali circa il 50% è stato identificato come acidi fosfatidici<sup>[18]</sup>. Per isolare tali nanoparticelle sono state utilizzate la centrifugazione differenziale e l'ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio, mentre per determinare la loro composizione lipidica è stato impiegato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. È stata riportata anche la presenza di una quantità estremamente bassa (circa 2%) di lipidi vegetali tipici, ad esempio galattolipidi, come il digalattosildiacilglicerolo (DGDG) e il monogalattosildiacilglicerolo (MGDG).

Per quanto riguarda, invece, il **contenuto proteico**, secondo Yang et al. ci sono pochi rapporti disponibili e anche i risultati non sono perfettamente coerenti<sup>[17]</sup>. È stato riportato come negli esosomi di origine vegetale tale componente risulti relativamente ridotta rispetto agli esosomi derivati da cellule animali mammifere e anche il tipo di proteine espresse era diverso<sup>[19]</sup>. Come menzionato da Ju et al., dall'analisi mediante spettrometria di massa, le nanoparticelle isolate dall'uva presentavano 28 proteine<sup>[18]</sup>; secondo un altro studio, invece, quelle isolate dal pompelmo ne presentavano circa 137<sup>[20]</sup>.

Zhang et al. hanno descritto come le vescicole isolate dallo zenzero consistano principalmente in proteine citosoliche (soprattutto actine ed enzimi proteolitici); sono state identificate e quantificate anche alcune proteine di membrana in bassa quantità, come i canali/trasportatori di membrana (acquaporine e canali del cloro)<sup>[19]</sup>. Raimondo et al. hanno identificato 580 proteine da nanovesicole isolate dal succo di limone attraverso un sistema di cromatografia liquida; circa il 57% di queste proteine si sovrapponeva a quelle osservate negli esosomi derivati da cellule mammifere, indipendentemente dall'origine delle cellule<sup>[21]</sup>.

Per quanto concerne, invece, il contenuto in **acidi nucleici** come mRNA, miRNA e RNA non codificanti, esso sembra essere simile a quello degli esosomi derivati da cellule mammifere<sup>[19]</sup>. I miRNA, in particolare, sono un gruppo di molecole di RNA a singolo filamento contenenti solo 18–24 nucleotidi, che svolgono ruoli importanti nella regolazione post-trascrizionale negli organismi animali e vegetali<sup>[22]</sup>.

Le nanovesicole di origine vegetale trasportano un numero significativo di miRNA, in particolare 125 nel caso di quelle isolate dallo zenzero<sup>[22]</sup>; tra questi, 124 miRNA potrebbero potenzialmente regolare l'espressione genica nell'uomo legandosi alle regioni 3'

non tradotte. Nelle vescicole isolate dall'uva, invece, sono stati riscontrati 96 miRNA tramite spettrometria di massa<sup>[19]</sup>. Recentemente sono stati identificati 418 miRNA in 11 frutti e verdure commestibili (da 32 per lo zenzero a 127 per la soia)<sup>[23]</sup>.

Il confronto tra i diversi metodi di rilevamento di lipidi e proteine può spiegare le differenze nella composizione lipidica e nelle proteine rilevate, ma anche nelle proprietà biologiche mostrate dalle varie vescicole.

## **CAPITOLO 2.**

### **APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEGLI ESOSOMI VEGETALI**

#### **2.1. Proprietà antinfiammatorie**

Le nanovesicole di origine vegetale hanno dimostrato di svolgere un ruolo importante nel **mantenimento dell'omeostasi immunitaria intestinale** attraverso la comunicazione con le cellule del tratto digerente. La colite ulcerosa, in particolare, rappresenta una delle principali malattie infiammatorie croniche intestinali; i farmaci steroidei convenzionali e gli immunosoppressori mostrano scarsi effetti terapeutici a causa del targeting non specifico nei confronti della patogenesi e una tossicità inevitabile per le cellule sane. Di conseguenza, per il trattamento di tale patologia è essenziale lo sviluppo di sistemi non tossici che mirino ai tessuti del colon e che abbiano elevate proprietà antinfiammatorie.

Uno studio ha dimostrato che le nanovesicole derivate dal pompelmo, estratte con centrifugazione in gradiente di saccarosio, sono captate selettivamente dai macrofagi intestinali e migliorano la colite indotta dal destrano solfato di sodio (DSS) nei topi<sup>[20]</sup> (Figura 4A). Gli effetti antinfiammatori delle nanovesicole sembrano essere dovuti alla stimolazione dell'espressione dell'eme ossigenasi-1 e all'inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nei macrofagi intestinali. Inoltre, le nanovesicole del pompelmo hanno mostrato biocompatibilità, biodegradabilità e stabilità intrinseche su un'ampia gamma di valori di pH. Queste proprietà, almeno in teoria, rendono tali vescicole un ottimo mezzo per la somministrazione orale di farmaci antinfiammatori, come il metotrexato, allo scopo di ridurre la citotossicità del farmaco e migliorarne l'effetto terapeutico.

Un'alternativa studiata sono le nanoparticelle derivate dallo zenzero, isolate da quest'ultimo e poi purificate mediante centrifugazione in gradiente di saccarosio. I lipidi totali che compongono tali vescicole, estratti utilizzando il metodo Blich-Dyer, potrebbero rappresentare un nuovo sistema di trasporto di siRNA per la terapia della colite ulcerosa<sup>[27]</sup>. I siRNA (short interfering RNA) sono una classe di molecole di RNA a doppio filamento, di lunghezza compresa tra 19 e 21 nucleotidi, in grado di svolgere numerosi ruoli biologici.

Tra questi, in particolare, sono coinvolti nel pathway della RNA interference, che porta all'interferenza dell'espressione di specifici geni con sequenze nucleotidiche complementari, degradando l'mRNA dopo la trascrizione e inibendo così la traduzione. In seguito all'azione del siRNA contro il CD98, un gene indotto dalla colite ulcerosa, i liposomi estratti dallo zenzero potrebbero mirare specificamente alle cellule epiteliali intestinali e trasportare il siRNA-CD98 per ridurre l'espressione dell'omonimo gene nel colon. L'uso di questo vettore di siRNA, inoltre, richiede una dose 10.000 volte inferiore a quella del siRNA libero ed è meno tossico rispetto alla formulazione commerciale dei liposomi "DC-Chol/DOPE", usata per trattare l'infiammazione intestinale.

Inoltre, il sistema immunitario gastroenterico può essere regolato da nanovesicole di origine vegetale anche attraverso la **modulazione di diverse vie enzimatiche**. Per esempio, le nanoparticelle derivate dai broccoli, estratte dal succo di broccoli per centrifugazione e isolate attraverso una pompa regolata a pressione, possono inibire la colite nel topo attivando l'AMPK espresso dalle cellule dendritiche dell'intestino<sup>[25]</sup>. L'AMPK, in particolare, è un enzima cardine nella regolazione dell'omeostasi immunitaria, espresso da diversi tipi di cellule immunitarie, tra cui macrofagi, linfociti, neutrofili e cellule dendritiche, e ne regola una serie di funzioni, tra cui la produzione di citochine, chemiotassi, citotossicità, apoptosi e proliferazione.

Un'altra possibilità per la modulazione della risposta immunitaria consiste nel **regolare l'attivazione di particolari inflammasomi**, complessi molecolari citoplasmatici che vengono attivati in caso di infezione o stress cellulare, innescando la maturazione di citochine proinfiammatorie e stimolando la risposta immunitaria innata. Tra questi, evidenze recenti hanno messo in luce come l'attività inappropriata dell'inflammasoma NLRP3 possa contribuire alla patogenesi di una varietà di patologie, tra cui la malattia di Alzheimer e il diabete di tipo 2<sup>[28]</sup>.

In particolare, le nanovesicole estratte dalle radici di zenzero attraverso centrifugazione e purificazione in gradiente di saccarosio hanno mostrato effetti inibitori sull'attivazione dell'inflammasoma NLRP3<sup>[24]</sup>. La loro somministrazione, infatti, sembra sopprimere alcune vie necessarie per l'attivazione e l'assemblaggio dell'inflammasoma, tra cui l'autoclivaggio della caspasi-1, la secrezione di IL-1 $\beta$ , IL-18 e la piroptosi, una morte cellulare programmata proinfiammatoria. Il meccanismo molecolare alla base di tale

attività inibitoria è stato attribuito alla capacità dei componenti lipidici in esse contenuti di bloccare l'assemblaggio degli inflammasomi NLRP3.

## 2.2. Proprietà rigenerative e di rimodellamento

L'intestino umano è esposto quotidianamente a miliardi di nanovesicole provenienti dagli alimenti ingeriti. Le nanovesicole di origine vegetale hanno un profondo impatto sul tratto intestinale, in particolare sul **rinnovamento** e sul **rimodellamento dei tessuti**.

Per esempio, le nanoparticelle derivate dall'uva, isolate mediante centrifugazione differenziale e ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio, hanno mostrato la capacità di promuovere la proliferazione delle cellule staminali intestinali nei topi<sup>[18]</sup>. In seguito a somministrazione di nanovesicole d'uva, una serie di geni tra cui axin-2, ciclina D1, c-myc ed egfr, che regolano la crescita delle cellule staminali intestinali, erano stati significativamente stimolati attraverso la via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina. Al contrario, il blocco delle vie di segnalazione mediate dalla  $\beta$ -catenina ha attenuato la produzione di cellule staminali. Il medesimo studio ha mostrato anche che le nanovesicole derivate dall'uva possono promuovere direttamente la proliferazione delle cellule staminali intestinali e accelerare la formazione di organoidi a forma di cripta da una singola cellula staminale. Inoltre, le nanovesicole d'uva somministrate per via orale sembrano anche proteggere i topi dalla colite indotta da destrano solfato di sodio (DSS) attraverso la crescita e la proliferazione di cellule staminali intestinali. Pertanto, esse mostrano la capacità di modulare i processi di rinnovamento cellulare e di partecipare al processo di rimodellamento in risposta a trigger patologici, essendo inoltre resistenti alla degradazione da parte della saliva, dell'ambiente acido dello stomaco e degli enzimi proteolitici presenti lungo il tratto intestinale<sup>[18]</sup>.

Altre nanovesicole di origine vegetale ampiamente studiate, quelle derivate dallo zenzero, isolate mediante centrifugazione in gradiente di saccarosio, hanno dimostrato di proteggere i topi dal danno epatico indotto dall'alcol<sup>[11]</sup> (Figura 1C). In seguito a somministrazione di nanoparticelle di zenzero, gli epatociti primari avevano una traslocazione nucleare significativamente aumentata del factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), che regola l'espressione genica di molti enzimi citoprotettivi. Nello specifico, l'attivazione di Nrf2

mediata dalle nanoparticelle di zenzero ha portato all'induzione di geni disintossicanti/antiossidanti nel fegato tra cui ho-1, nqo1, gclm e gclc, e all'eliminazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), con conseguente beneficio in termini di protezione del fegato dal danno derivato dall'alcool. Inoltre, è stato individuato il componente chiave delle nanoparticelle dello zenzero, il lipide shogaol, che determina l'induzione di Nrf2 secondo una modalità TLR4/TRIF-dipendente. Queste evidenze dimostrano non solo che le nanoparticelle di zenzero potrebbero essere utilizzate come una nuova nanomedicina per proteggere il fegato dai danni indotti dall'alcol, ma forniscono anche una base per svelare il meccanismo molecolare alla base delle comunicazioni interspecie mediate da diversi tipi di nanovesicicole vegetali che vengono ingerite quotidianamente.

### 2.3. Proprietà di modulazione del microbiota commensale

Il numero di cellule batteriche in un corpo umano adulto sano è di circa 100 trilioni, 10 volte superiore a quello delle cellule umane. Le condizioni del microbiota commensale sono strettamente legate alla salute umana, poiché esso partecipa a varie attività fisiologiche che vanno dalla degradazione del cibo alla regolazione immunitaria, pertanto la disbiosi del microbioma commensale può causare numerosi problemi di salute.

Negli ultimi decenni molti studi hanno dimostrato l'esistenza di una relazione tra dieta e microbiota, soprattutto per quanto riguarda il microbiota intestinale, e le piante commestibili, comprese le erbe, possono regolarne la composizione<sup>[34]</sup>.

Recenti lavori di ricerca hanno dimostrato che le nanovesicicole vegetali sono stabili nell'intestino e possono essere captate dai batteri commensali, generando **cambiamenti nel microbiota intestinale** e influenzando l'ospite. Per esempio, Teng et al. hanno osservato che i batteri intestinali *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) possono essere regolati dall'sRNA dalle nanovesicicole di zenzero attraverso il legame con l'mRNA batterico<sup>[35]</sup> (Figura 1D). Le nanovesicicole, in particolare, sembrano essere assorbite preferenzialmente da LGG in base al contenuto lipidico. Gli esperimenti in vivo hanno mostrato che la somministrazione orale di nanovesicicole di zenzero promuove la crescita di LGG; il meccanismo è principalmente attribuito ai piccoli RNA trasportati dalle nanovesicicole che si legano a vari geni di LGG. Per esempio, gma-miR396e ha come bersaglio l'mRNA del repressore di trascrizione LexA di LGG, riducendo così il livello di espressione di LexA; Mdo-

miR7267-3p, invece, agisce contro il gene *ycnE* di LGG, sopprimendo la monoossigenasi e aumentando l'indolo-3-carbossaldeide (I3A). L'eccesso di I3A induce la secrezione di IL-22, che migliora la funzione della barriera intestinale e migliora la colite del topo. Infine, miR167a-5p agisce contro il gene *SpaC* della proteina specifica per i pili di LGG, responsabile della migrazione batterica. Con una minore espressione delle proteine *SpaC* sui pili, le capacità di LGG di invadere le cellule epiteliali dell'intestino e di migrare nel flusso sanguigno e nel fegato sono ridotte.

Un altro lavoro di ricerca ha dimostrato che le nanovesicole derivate dallo zenzero proteggono l'ambiente orale **inibendo la patogenicità del *Porphyromonas gingivalis***, microrganismo che ha un ruolo importante nella parodontite cronica<sup>[36]</sup>. Esperimenti in vivo dimostrano che il trattamento con nanovesicole derivate dallo zenzero diminuisce significativamente la perdita di osso alveolare indotta da *P. gingivalis* e il rilascio di fattori di infiammazione. L'acido fosfatidico insaturo (34:2) delle nanovesicole dello zenzero facilita l'assorbimento delle stesse da parte del *P. gingivalis* attraverso l'interazione tra l'acido fosfatidico e la proteina 35 che lega l'emina sulla superficie batterica. L'acido fosfatidico e i miRNA delle nanovesicole inibiscono in maniera preferenziale l'espressione di diversi fattori di virulenza e sopprimono l'adesione e l'invasione di *P. gingivalis* nelle cellule epiteliali orali.

## 2.4. Proprietà antitumorali

Le nanovesicole di origine vegetale mostrano una serie di attività promettenti che potrebbero essere utilizzate nella terapia medica contro il cancro:

1. **Attivazione del segnale apoptotico delle cellule tumorali:** il tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) è un bersaglio chiave che induce selettivamente l'apoptosi delle cellule tumorali senza colpire le cellule sane.

Alcune nanovesicole di origine vegetale mostrano una capacità di attivazione del segnale mediato dal TRAIL; ad esempio, Raimondo et al. hanno riportato che le nanovesicole derivate dal limone possono inibire la proliferazione di diversi tipi di cellule tumorali solide ed ematologiche in vitro e sopprimere la crescita tumorale della leucemia mieloide cronica in vivo<sup>[21]</sup>. In particolare, in seguito alla loro

somministrazione, è stato osservato un livello selettivamente aumentato di TRAIL e del suo recettore Dr5 nelle linee cellulari tumorali, evidenziando quindi la capacità delle nanovesicole derivate dal limone di indurre l'apoptosi delle cellule tumorali. Nello specifico, una dose di 20 µg/ml ha indotto una riduzione della crescita del 50% delle cellule tumorali a 48 ore; nel modello di xenotrapianto del tumore, al giorno 21 post-trapianto, il peso del tumore nei topi trattati era circa del 15–30% rispetto al controllo.

2. **Regolazione dei fattori infiammatori:** Zhang et al. hanno messo in evidenza come le nanoparticelle derivate dallo zenzero possano prevenire il tumore associato alla rettocolite ulcerosa<sup>[19]</sup> che rappresenta una delle maggiori complicanze a lungo termine di questa patologia. In seguito alla somministrazione orale di nanoparticelle di zenzero nei topi, infatti, il livello di mRNA delle citochine pro-infiammatorie IL-6, IL-1β, e ciclina D1 legato alla proliferazione tumorale risulta sostanzialmente diminuito, così come il numero di neoplasie sviluppate. Questo risultato rivela come le nanoparticelle derivate dallo zenzero possano quindi potenzialmente inibire la tumorigenesi coloretale riducendo i livelli di citochine pro-infiammatorie.

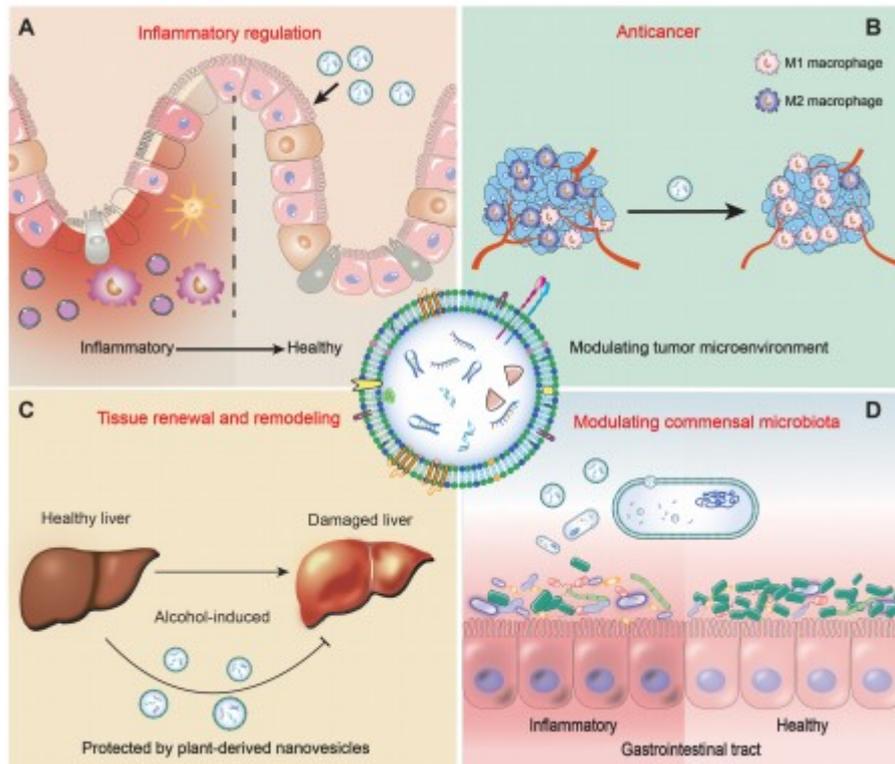
3. **Modulazione del microambiente tumorale:** i macrofagi associati al tumore sono un importante componente del microambiente tumorale. Le cellule neoplastiche, infatti, producono citochine e chemochine che richiamano macrofagi, i quali favoriscono la sopravvivenza delle cellule tumorali attraverso immunosoppressione, invasione, metastasi e angiogenesi. In generale essi possono essere distinti in due fenotipi opposti, i macrofagi tumoricidi (M1) e quelli di supporto al tumore (M2). La maggior parte dei tumori è associata ad un rapporto M1/M2 più basso<sup>[29]</sup>, per cui stimolare la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M1 può essere utile per inibirne la crescita.

Esperimenti in vivo hanno dimostrato che le nanoparticelle derivate dal ginseng possono inibire efficacemente la crescita del melanoma alterando la polarizzazione dei macrofagi<sup>[30]</sup> (Figura 1B). Rispetto al gruppo di controllo, il rapporto M1/M2 dei topi B16F10–allograpiantati trattati con nanoparticelle derivate dal ginseng era significativamente migliorato al giorno 12 e il peso del tumore dei topi trattati era

ridotto del 53%. In particolare la soppressione della polarizzazione M2 dei macrofagi sembra essere mediata da ligandi specifici trasportati dalle nanoparticelle derivate dal ginseng, in grado quindi di interagire con il recettore Toll-like 4, con conseguente attivazione della via dipendente dall'antigene di differenziazione mioeloide 88, che favorisce quindi la differenziazione dei macrofagi in senso M1.

4. **Sistema di somministrazione dell'agente terapeutico:** i lipidi sono attualmente i vettori preferiti per la somministrazione dei farmaci in vivo, ma i liposomi sintetici e le nanoparticelle lipidiche possono produrre effetti indesiderati, come stress cellulare, attivazione di inflammasomi e apoptosi<sup>[31]</sup>. Come strategia alternativa è stato suggerito l'uso di nanovettori "naturali" non tossici assemblati da lipidi derivati da nanoparticelle vegetali. In particolare, Zhang et al. hanno dimostrato la fattibilità della generazione di nanovettori "naturali" da lipidi derivati da nanoparticelle di zenzero. Questi nanovettori non mostravano alcuna citotossicità nei confronti della barriera intestinale, suggerendo come possano essere utili per un'efficiente somministrazione di farmaci in vivo, nello specifico la doxorubicina<sup>[14]</sup>. Essa è stata incorporata in esosomi derivati dallo zenzero e coniugati con acido folico allo scopo di agire contro il tumore del colon, riducendone il volume, inducendo una maggiore apoptosi e diminuendone la proliferazione nei topi, estendendo anche il tempo di circolazione fino a 48 ore e aumentando così la sua efficacia. Allo stesso modo, Wang et al. hanno dimostrato come le nanoparticelle lipidiche derivate dal pompelmo possano fungere da trasportatori di agenti chemioterapici, siRNA, vettori di espressione del DNA e proteine a diversi tipi di cellule<sup>[32]</sup>. Agenti chemioterapici trasportati attraverso nanovettori esosomiali vegetali derivati dal pompelmo hanno efficacemente inibito la crescita di tumori derivati dalle cellule CT26 e SW620 nei topi. Gli autori hanno dimostrato come i suddetti vettori fossero meno tossici delle nanoparticelle lipidiche sintetiche e non attraversassero la barriera materno-fatale quando somministrate per via endovenosa in topi in stato di gravidanza, suggerendo che potrebbero rivelarsi utili per la somministrazione di farmaci anche in tale contesto. Infine, un ulteriore studio di Teng et al. ha messo in evidenza come i lipidi derivati dal pompelmo facilitino la somministrazione di miRNA utilizzati a scopo terapeutico, tra cui il miR-18a. In particolare, sembra che esso possa agire come

soppressore tumorale, inibendo la crescita delle metastasi epatiche del tumore del colon-retto attraverso l'induzione di macrofagi di tipo M1, fenotipo con attività antitumorale, e l'inibizione di macrofagi di tipo M2, fenotipo che promuove la progressione tumorale<sup>[33]</sup>.



**Figura 4.** Possibili applicazioni mediche delle nanovesicole derivate da alimenti vegetali: regolazione dell'inflammatione (A), azione antitumorale (B), rinnovamento e rimodellamento dei tessuti (C), modulazione del microbiota commensale (D)<sup>[39]</sup>.

## 2.5. Utilizzo come vettori per la somministrazione di farmaci

Attualmente, il campo della terapia farmacologica molecolare è limitato dalla mancanza di vettori che permettono un trasporto ad alta efficienza verso le cellule bersaglio senza una conseguente citotossicità o risposta immunitaria dell'ospite<sup>[32]</sup>. Da questo punto di vista, la nanotecnologia può essere considerata una possibile strategia, grazie alla capacità delle nanoparticelle di **trasportare sostanze farmacologiche** idrofobiche e di raggiungere selettivamente il sito di malattia. In particolare, le nanovesicole derivate da alimenti di origine vegetale possono essere considerate migliori come potenziali vettori di farmaci

rispetto ad altri sistemi già utilizzati (virali e non virali), poiché non sono tossiche, hanno la potenzialità di essere manipolate/modificate per il garantire il raggiungimento del target specifico, sono in grado di incapsulare una vasta gamma di agenti terapeutici e possono essere prodotte su larga scala<sup>[32]</sup>.

In uno studio, i nanovettori lipidici delle nanovesicole derivate dal pompelmo, rivestiti con membrane arricchite di recettori di leucociti attivati, sono stati utilizzati per rilasciare doxorubicina in siti tumorali infiammati<sup>[37]</sup>; tale rivestimento ha aumentato la stabilità e la rilevabilità spettrofotometrica delle nanovesicole. Secondo lo studio, tali vettori erano in grado di inglobare diversi farmaci, tra cui chemioterapici, come la *doxorubicina*, ma anche agenti anti-infiammatori come la *curcumina*. Esperimenti eseguiti in diversi modelli murini con malattie infiammatorie hanno riportato che tali membrane arricchite di recettori avevano una migliore efficienza di targeting del farmaco rispetto alle nanovesicole non rivestite. In questo caso, le nanovesicole contenenti 200 µg di doxorubicina sono state iniettate per via endovenosa in topi portatori di tumore 4T1; dopo 24 ore, i tessuti tumorali sono stati estratti e rilevati dalla misurazione spettrofotometrica.

Allo stesso modo, Teng et al. hanno evidenziato come le nanovesicole lipidiche derivate dal pompelmo, incapsulate con *miR-18a*, possano essere assorbite dalle cellule Kupffer del fegato e visualizzate alla microscopia confocale dopo 1 e 24 ore dall'iniezione endovenosa<sup>[33]</sup>. Il trattamento con nanovesicole contenenti miR-18a ha simulato l'azione dei macrofagi M1, responsabili dell'attività antitumorale e, allo stesso tempo, ha regolato l'azione dei macrofagi M2, che favoriscono la progressione tumorale. Dopo 14 giorni dall'iniezione intrasplenica di cellule tumorali del colon CT26, il numero e le dimensioni delle metastasi epatiche erano ridotti e la sopravvivenza dei topi si era estesa<sup>[33]</sup>.

Zhang et al., invece, hanno valutato come vettori farmacologici i lipidi delle nanovesicole dello zenzero, in cui sono stati incapsulati *siRNA*<sup>[27]</sup>. I nanovettori lipidici derivati dallo zenzero sono risultati non tossici se confrontati con i liposomi commerciali e sono stati assorbiti con successo dai macrofagi RAW 264.7 e dalle cellule Colon-26 (valutati mediante microscopia confocale dopo un'incubazione di 8 ore). L'aggiunta del siRNA-CD98 nei nanovettori lipidici derivati dallo zenzero ha permesso il trasporto di una bassa dose di siRNA-CD98 (30 pmol) e ha ridotto l'espressione genica del CD98 del colon.

In un altro studio, i lipidi delle nanovesicole del pompelmo sono stati isolati, riassemblati e rivestiti con *acido folico* per migliorare l'efficienza di target verso le cellule bersaglio che esprimono i recettori dei folati<sup>[32]</sup>. È stato riportato che tali vettori non erano tossici né in vitro (fino a 200 nmol di lipidi/ml) né in vivo (100 nmol di lipidi per via endovenosa in topi per 5 giorni) e potevano inglobare agenti idrofobici, tra cui curcumina, acido folico e Zymosan A (immunostimolante) senza alterare le attività biologiche. Le nanovesicole del pompelmo rivestite con acido folico sono state impiegate anche per trasportare il farmaco chemioterapico *paclitaxel* (20 mg/kg di peso corporeo) per via endovenosa nella sede del tumore, e questo ha ridotto il volume del tumore in due modelli di xenotrapianto tumorale, comprese le cellule CT26 del topo e le cellule SW620<sup>[32]</sup>.

Lo studio di Zhang et al.<sup>[14]</sup>, già menzionato per l'attività delle nanovesicole dello zenzero contro il cancro al colon, ha anche dimostrato che esse erano internalizzate con successo dalle cellule Colon-26 e HT-29 per fagocitosi dopo un'incubazione di 4 ore, come rilevato dall'analisi della citometria a flusso, e non erano tossici né in studi in vitro (fino a 200  $\mu$ mol di lipidi/l, rilevati dopo 4 ore di incubazione) né in vivo (mediante iniezione endovenosa di 200  $\mu$ mol di lipidi/l e misurazione mediante colorazione ematossilina eosina dopo 7 giorni). L'incapsulamento del farmaco chemioterapico *doxorubicina* nelle nanovesicole stesse (13  $\mu$ mol/l) ha garantito il prolungamento del rilascio del farmaco, producendo una rapida apoptosi.

Le nanovesicole di origine vegetale, però, possono incapsulare una grande varietà di molecole, come piccoli farmaci molecolari, siRNA, vettori di espressione del DNA e proteine, dirigendoli verso determinati tessuti<sup>[30,47]</sup>.

In particolare, uno studio su modelli murini ha riportato il potenziale delle nanovesicole del pompelmo rivestite con acido folico con l'aggiunta di polietilenimina/RNA come trasportatori di *miRNA* in modo efficiente al cervello per via intranasale. L'acido folico è stato utilizzato per migliorare il targeting verso le cellule tumorali cerebrali GL26, che esprimono i recettori del folato, e la polietilenimina è stata aggiunta per la sua alta efficienza nel trasportare RNA e DNA. I topi sono stati trattati ogni 3 giorni per 21 giorni a partire dal 5° giorno dopo l'impianto intracranico delle cellule GL26. Gli effetti del trattamento sono stati valutati mediante colorazione immunitaria del tessuto cerebrale post-fissato con anticorpi anti-DX5, luciferasi e MHCI<sup>[38]</sup>. L'induzione di cellule NK DX5<sup>+</sup> era

correlata a una diminuzione dell'espressione delle cellule GL26 MHC1<sup>+</sup> luciferasi<sup>+</sup>, indicando che il vettore farmacologico rivestito viene assunto selettivamente dalle cellule GL26 e successivamente inibisce la loro espressione di MHC1, innescando l'attivazione delle cellule NK, che ne mediano la distruzione. I topi trattati per via intranasale con tale vettore hanno mostrato anche una crescita rallentata delle cellule GL26<sup>[38]</sup>.

In un altro studio, l'effetto in vivo del *sulforafano* contenuto in nanovesicicole derivate dai broccoli è stato studiato nella colite acuta del topo indotta da destrano solfato di sodio<sup>[25]</sup>. Il farmaco incapsulato nelle nanovesicicole ha prodotto ottimi risultati sia in termini di punteggio istologico sia di minore riduzione della lunghezza del colon. È stato anche riportato il contributo del sulforafano sulla capacità migratoria in vivo delle cellule dendritiche CD11b<sup>+</sup> dal numero inferiore di queste ultime nei linfonodi mesenterici e nel colon dei topi trattati.

**Tabella 1.** Nanovesicicole di origine vegetale come vettori farmacologici<sup>[12]</sup>.

| Fonte dei nanovettori | Bersaglio                                       | Farmaco  |
|-----------------------|---|--|
| Pompelmo              | Tumore del colon                                | Doxorubicina, curcumina <sup>[37]</sup>                                      |
|                       | Cellule tumorali (4T1, GL26, A549, CT26, SW620) | JSI-124 (inibitore anti-Stat3), paclitaxel, siRNA luciferasi <sup>[32]</sup> |
|                       | Cellule tumorali cerebrali GL26                 | miR17 <sup>[38]</sup>  |
|                       | Macrofagi intestinali                           | Metotrexato <sup>[20]</sup>  |
|                       | Cellule epatiche di Kupffer                     | miR-18a <sup>[33]</sup>  |
| Broccoli              | Tessuto del colon                               | Sulforafano <sup>[25]</sup>  |
| Limone                | Leucemia mieloide cronica                       | Proteine <sup>[21]</sup>   |
| Zenzero               | Linee cellulari di tumore del colon             | Doxorubicina <sup>[14]</sup>   |
|                       | Cellule colon-26 e HT-29<br>Macrofagi RAW 264.7 | siRNA-CD98 <sup>[27]</sup>   |
|                       | Cellule epiteliali intestinali                  | miRNA, 6-gingerolo e 6-shogaol <sup>[19]</sup>                               |

## CAPITOLO 3.

### IL MICROBIOTA ORALE

Il termine "**microbiota orale**" indica una comunità ecologica di microrganismi commensali, simbiotici e patogeni presenti nel cavo orale. Il microbiota orale è presente generalmente sotto forma di biofilm e svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi, proteggendo il cavo orale e prevenendo lo sviluppo di malattie.

#### 3.1. Composizione del microbiota orale

La cavità orale contiene oltre 700 specie microbiche tra batteri commensali e opportunisti, archei, funghi, protozoi e virus. Ogni specie svolge il suo ruolo specifico e interagisce in maniera importante con le altre specie e con l'ospite<sup>[40]</sup>.

##### 3.1.1. Batteri

I **batteri** rappresentano la componente principale del microbiota orale. Gran parte della conoscenza riguardo alla composizione dei batteri orali proviene da metodi precedentemente utilizzati basati sulla coltura; queste tecniche hanno portato all'identificazione di microrganismi specifici che si pensava avessero un ruolo causale nella carie e nella parodontite. Tuttavia, questi dati hanno sottostimato la composizione del microbioma orale. Lo sviluppo di metodi innovativi, in particolare mirando alla valutazione dell'RNA ribosomiale 16S, ha ampliato la consapevolezza rispetto alla grande ricchezza e diversità del microbioma orale.

La comunità batterica orale è dominata dai sei phyla principali, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* e *Fusobacteria*, che rappresentano il 94% dei taxa rilevati. I phyla rimanenti, *Saccharibacteria*, *Synergistetes*, *SRI*, *Gracilibacteria*, *Chlamydia*, *Chloroflexi*, *Tenericutes* e *Chlorobi*, costituiscono il restante 6%, come risulta dallo Human Oral Microbiome Database.

Sebbene l'attuale conoscenza riguardo ai microrganismi del cavo orale sia stata gradualmente approfondita negli ultimi anni, c'è ancora una grande percentuale di batteri

che non può essere coltivata in laboratorio. La ragione principale riguarda il fatto che le condizioni a cui questi microrganismi sono sottoposti in vivo non riescono ad essere riprodotte completamente. Molti microrganismi, infatti, hanno requisiti unici per la sopravvivenza, come nutrienti specifici, temperatura, pH e interazione con altre specie microbiche<sup>[41]</sup>.

### 3.1.2. Funghi

I **funghi** sono ampiamente presenti nel cavo orale, non solo come patogeni opportunisti (soprattutto negli anziani e negli immunodepressi), ma anche come componenti del microbiota orale sano<sup>[41]</sup>. Uno studio ha riportato una caratterizzazione dettagliata dei funghi orali in soggetti sani, in cui sono presenti fino a 101 specie<sup>[42]</sup>. È stato anche osservato che il numero di specie fungine nel cavo orale dei singoli individui varia tra 9 e 23, tra cui le specie di *Candida* sono le più frequenti, seguite da *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cryptococcus*.

### 3.1.3. Archei

Gli **archei** costituiscono solo una piccola parte del microbioma orale e si limitano a poche specie, in particolare *Thermoplasmatales*, *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* e *Methanosphaera*, tutte specie metanogene. Possono essere ritrovati in soggetti sani, ma la loro prevalenza e il loro numero sono elevati in individui con parodontite<sup>[41]</sup>.

### 3.1.4. Virus

La maggior parte dei **virus** nel cavo orale è legata a patologie, ad esempio l'Herpes Simplex Virus causa la gengivo-stomatite erpetica primaria, la malattia mucocutanea orofacciale e lesioni ricorrenti su viso e labbra. Anche il Papilloma Virus umano causa diverse lesioni a livello del cavo orale, tra cui papillomi orali benigni, condilomi orali e iperplasia epiteliale focale. Infine, anche l'infezione da HIV può causare indirettamente alcune manifestazioni orali, come la candidosi, la leucoplachia pelosa orale, l'eritema gengivale lineare, la parodontite ulcerativa necrotizzante e il sarcoma di Kaposi<sup>[41]</sup>.

**Tabella 2.** Generi batterici presenti nel cavo orale recentemente descritti (dal 1990)<sup>[43]</sup>.

| PHYLUM                | GENERI  |
|-----------------------|---|
| <i>Actinobacteria</i> | Actinobaculum, Atopobium, Cryptobacterium, Kocuria, Olsenella, Parascardovia, Scardovia, Slackia, Tropheryma  |
| <i>Bacteroidetes</i>  | Bergeyella, Prevotella, Tannerella  |
| <i>Firmicutes</i>     | Abiotrophia, Anaerococcus, Aneroglobus, Bulleidia, Catonella, Dialister, Filifactor, Finegoldia, Granulicatella, Johnsonella, Mogibacterium, Parvimonas, Peptoniphilus, Pseudoramibacter, Schwartzia, Shuttleworthia, Solobacterium |
| <i>Proteobacteria</i> | Lautropia, Suttonella   |
| <i>Synergistetes</i>  | Jonquetella, Pyramidobacter   |

### 3.2. Localizzazione del microbiota orale

L'ecosistema orale è molto complesso poiché presenta diverse nicchie significativamente differenti tra loro, tra cui la saliva, le superfici dei tessuti molli (mucosa orale e lingua), e le superfici dei tessuti duri (denti). Le diverse superfici attraggono comunità microbiche distinte perché ogni nicchia fornisce un ecosistema unico con condizioni e nutrienti ottimali per i microrganismi che la compongono<sup>[41]</sup>. Uno studio ha evidenziato come i profili di 40 specie batteriche mostrassero evidenti differenze quando riscontrate nella saliva, nelle superfici dei tessuti molli e nelle placche sopragengivali e subgengivali di soggetti sani<sup>[44]</sup>.

#### 3.2.1. Saliva

La **saliva** contiene fino a  $10^9$  microrganismi/ml che vengono inghiottiti continuamente, pertanto si ritiene che non abbia un proprio microbiota residente, e che il numero di batteri al suo interno, a differenza della placca dentaria, non si moltiplichi nel tempo ma tenda a rimanere costante. Tuttavia, essa costituisce la fonte primaria per la continua (ri)colonizzazione batterica delle diverse superfici orali molli e dure, che sono continuamente in contatto con essa<sup>[41]</sup>.

I microrganismi salivari, in particolare, provengono principalmente dallo spargimento del biofilm sulla superficie dei tessuti orali, pertanto il profilo microbico della saliva è simile a quello dei tessuti molli, ma la colonizzazione della saliva e dei tessuti molli differisce

comunque da quella della placca dentale. Sono stati identificati circa 3621 taxa batterici nella saliva di 98 soggetti sani, e i phyla predominanti erano *Firmicutes* (generi *Streptococcus* e *Veillonella*) e *Bacteroidetes* (genere *Prevotella*)<sup>[45]</sup>.

In generale si pensa che l'iposalivazione contribuisca allo sviluppo delle malattie orali; uno studio, analizzando la microflora di campioni salivari provenienti da soggetti sani e soggetti con iposalivazione, ha evidenziato che il numero di microrganismi acidogenici e acidurici era aumentato in quest'ultimo gruppo<sup>[46]</sup>. Inoltre, il microbiota salivare potrebbe essere usato come potenziale marcatore diagnostico e prognostico per alcune malattie specifiche, come la carie e il carcinoma orale<sup>[47]</sup>.

### 3.2.2. Superficie dei tessuti molli

Nonostante il costante ricambio degli strati epiteliali superficiali, la **mucosa orale** è colonizzata in maniera persistente da microrganismi. Tuttavia, rispetto ad altre nicchie orali, questo sembra avvenire in maniera limitata: le superfici delle guance e del palato presentano solo monostrati di batteri che originano e desquamano regolarmente. Al contrario, la superficie della **lingua** presenta multistrati di batteri simili a biofilm, pertanto si pensa che sia "abitata" da una maggiore densità e diversità di microrganismi rispetto ad altre superfici mucosali: il 30% della popolazione batterica rilevabile da studi molecolari è stato ritrovato solo sulla lingua<sup>[41]</sup>.

In particolare, si è osservato che i ceppi predominanti sulla superficie della lingua di soggetti sani sono *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa* e una specie non caratterizzata di *Eubacterium* (ceppo FTB41). Poiché le cripte della lingua permettono lo sviluppo di un microbiota anaerobio, la loro eccessiva colonizzazione da parte dei microrganismi di cui sopra sembra essere strettamente correlata allo sviluppo dell'alitosi<sup>[48]</sup>.

### 3.2.3. Superficie dei tessuti duri

La superficie del dente, non soggetta a desquamazione, fornisce un sito stabile per lo sviluppo del biofilm. La **placca dentale**, quindi, non è altro che un biofilm strutturalmente e funzionalmente organizzato presente sulle superfici dei denti, si forma in modo ordinato e rimane relativamente stabile nel tempo<sup>[41]</sup>. A seconda della posizione, essa si divide in

placca **sopragengivale** (sopra la linea gengivale) e **subgengivale** (sotto la linea gengivale), con comunità microbiche significativamente differenti. Uno studio, mediante la raccolta di placca sopragengivale da 98 soggetti sani, ha evidenziato che *Firmicutes* e *Actinobacteria* (genere *Corynebacterium* e *Actinomyces*) dominano in tale contesto<sup>[45]</sup>. La placca sopragengivale è associata alla carie sulle superfici occlusali e prossimali dei denti, in quanto i microrganismi che risiedono in queste nicchie tendono a produrre acido e/o sono resistenti a un ambiente acido.

A mano a mano che la placca sopragengivale si estende fino alla zona sottogengivale lungo la radice, il biofilm contiene progressivamente più siero e meno saliva, l'ambiente diventa anaerobico e il pH e la temperatura diventano estremi. Sulla base dei dati di sequenza rRNA 16S, il microbioma subgengivale predominante consiste di 347 specie o fenotipi che rientrano in 9 phyla batterici, tra cui *Obsidian Pool OP11*, *TM7*, *Deferribacteres*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobatteri* e *Bacteroidetes*<sup>[49]</sup>.

**Tabella 3.** Habitat microbici presenti nel cavo orale<sup>[43]</sup>.

| HABITAT   | NOTE   |
|---|--|
| Saliva  | Fase planctonica   |
|   | Deglutito continuamente  |
| Labbra, guance, palato<br>(desquamazione, monostrato)                   | Biofilm limitato dalla desquamazione   |
|   | Alcune superfici hanno tipologie specializzate di cellule ospiti   |
| Lingua<br>(desquamazione, multistrato)                                  | Superficie ricca di papille  |
|   | Agisce come un serbatoio per anaerobi obbligati  |
| Naturale (denti) e superfici<br>dure artificiali (materiali<br>dentari) | Superfici non desquamanti che permettono l'accumulo di grandi masse di microbi   |
|   | I denti hanno superfici distinte per la colonizzazione microbica; ogni superficie (es. fessure, superfici lisce, solchi gengivali) ospiterà una microflora distinta a causa delle proprie proprietà biologiche intrinseche |

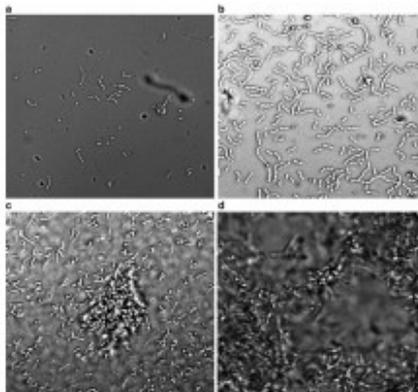
### 3.3. Successione ecologica nella formazione del biofilm

I batteri salivari colonizzano regolarmente le cellule della mucosa; tuttavia, nonostante i tessuti molli rappresentino l'80% delle superfici inclini alla colonizzazione batterica, non sorgono problemi patogenetici perché le cellule della mucosa si desquamano e vengono ingoiate, così come la saliva. Pertanto le superfici mucosali sono costituite solo da un monostrato non patogeno. Al contrario, i tessuti duri vengono rapidamente ricoperti dalla "pellicola" batterica e colonizzati, anche dopo una meticolosa igiene orale.

Dopo questa prima fase, il biofilm batterico cambia costantemente di giorno in giorno in un processo chiamato **successione**. In particolare, una "flora primaria" immediata dominata da Streptococchi muta, nel corso di 7 giorni di sviluppo, in una comunità anaerobica caratterizzata da batteri Gram-negativi. A causa delle diverse localizzazioni e dell'influenza di diversi fattori esogeni, si sviluppa una placca di differente spessore e composizione batterica, non solo su scala macroscopica ma anche a livello microecologico, in relazione alla pressione di O<sub>2</sub>, al pH locale, alla struttura della matrice e alla disponibilità di sostanze nutritive<sup>[43]</sup>. In questo modo si sviluppano diversi sottosistemi, di cui esempio è il modello di distribuzione sito-specifico dei microrganismi rilevanti per la parodontite, come descritto da Tanner et al.<sup>[50]</sup>.

Durante la successione è possibile osservare diverse fasi; questo vale non solo per il biofilm del cavo orale ma anche per tutti gli altri biofilm naturali, ad esempio quelli ambientali:

1. **Induzione:** è caratterizzata dal deposito di una serie di molecole che formano la cosiddetta "pellicola di condizionamento", ma talvolta sono già visibili i primi batteri;
2. **Accumulo:** comprende diversi aspetti come l'adesione, la crescita batterica e il cosiddetto "quorum sensing", un meccanismo che molte cellule batteriche della stessa specie utilizzano per comunicare;
3. **Evoluzione:** quando si verifica, questa fase è caratterizzata dall'equilibrio tra la crescita e la concomitante decomposizione batterica attraverso la cosiddetta "erosione (o desquamazione) del biofilm", per cui i gruppi di cellule vengono "rimossi" e si depositano su altre superfici.



**Figura 4.** Formazione del biofilm sullo smalto dentale visualizzato al microscopio confocale a scansione laser<sup>[43]</sup>.

### 3.4. Struttura del biofilm

Ci sono diverse definizioni del termine **biofilm**, in generale esso è definito come "un insieme di aggregati batterici, solitamente esistenti come comunità strettamente associate, che aderiscono a superfici naturali o artificiali, generalmente in un ambiente acquoso che contiene una concentrazione sufficiente di nutrienti per sostenere le esigenze metaboliche del microbiota"<sup>[43]</sup>. In questo senso la placca dentale mostra le caratteristiche generali dei biofilm; inoltre, come detto, ospita una vasta gamma di specie batteriche, per cui è estremamente eterogenea.

Nonostante il biofilm comprenda l'80–90% dei microrganismi, la ricerca si è concentrata sulla fase planctonica dei batteri negli ultimi 100 anni. Tuttavia, i biofilm contengono 1000 volte più batteri per grammo rispetto alla fase planctonica e sono 500–1000 volte più resistenti ai composti antibatterici. Non solo l'architettura e altre caratteristiche facilmente osservabili, come l'aderenza e le matrici extracellulari, sono importanti per definire le differenze rispetto alle cellule planctoniche, ma anche attributi intrinseci: i batteri che costituiscono il biofilm mostrano un fenotipo alterato rispetto al tasso di crescita, alla trascrizione genica e al quorum sensing. Inoltre, tali batteri possiedono una sostanziale resistenza non solo verso detergenti, antibiotici o altri composti antibatterici, ma anche verso processi messi in atto dall'organismo come la fagocitosi. In particolare sembrano evidenziarsi, all'interno di ogni biofilm, dei batteri definibili come "persisters" attraverso meccanismi complessi e multifattoriali che poi ne mediano la ricostituzione non appena la minaccia, endogena o esogena, viene meno.

**Tabella 4.** Caratteristiche del biofilm<sup>[43]</sup>.

| Parametro                                       | Fase planctonica                               | Biofilm   |
|---|--|---|
| <i>Definizione generale</i>                     | Non aderente, non localizzato                  | Aderente, localizzato   |
| <i>Densità</i>                                  | $10^8-10^9$ batteri/ml = $10^8-10^9$ batteri/g | $10^{11}-10^{12}$ batteri/cm <sup>3</sup> = $10^{11}-10^{12}$ batteri/g |
| <i>Comparsa</i>                                 | 10–20%   | 80–90%  |
| <i>Focus di ricerca</i>                         | 1880–1980                                      | 1960–oggi   |
| <i>Resistenza contro composti antibatterici</i> | Generalmente bassa                             | Generalmente alta o molto alta  |

### 3.5. Cambiamenti microbiologici età-correlati

È possibile distinguere due aspetti differenti associati ai **cambiamenti età-correlati**:

1. Cambiamenti realmente legati all'età;
2. Alterazioni dovute alla comparsa dei denti o all'implementazione di superfici dure artificiali, come dispositivi ortodontici, impianti o protesi.

Secondo Percival et al., a prima vista il microbiota non sembra cambiare nel corso dei decenni in coorti di età compresa tra 20 e 70 anni; infatti, non sono stati rilevati cambiamenti significativi età-correlati negli *Streptococcus mutans* associati alla carie e nelle *Spirochete* legate alla parodontite<sup>[51]</sup>. Tuttavia, sono state riscontrate delle differenze nei gruppi di età > 70 anni per quanto riguarda i *Lattobacilli*, gli *Stafilococchi* e i *lieviti*, che risultano aumentati in modo significativo. Nello specifico, questi aumenti non erano associati all'uso della protesi dentaria o alla malattia. È stato quindi ipotizzato che i veri responsabili siano da identificare nella multi-morbilità legata all'età e l'uso di più categorie di farmaci, che hanno come effetto collaterale una diminuzione della produzione di saliva, con conseguente acidificazione del cavo orale. Tuttavia, questi studi non hanno considerato bambini e adolescenti.

Per quanto riguarda il punto 2, un esempio evidente è rappresentato dall'eruzione dei denti che si verifica dal 6°–7° mese di vita, a partire dalla quale gli Streptococchi come *S. mutans* e *S. sobrinus* sono in grado di colonizzare le superfici dure dello smalto. Tuttavia, è solo dopo 1 anno che può essere riscontrata una corrispondente "finestra di infettività", tra 19 e 31 mesi di età, con una mediana di 26 mesi<sup>[52]</sup>. Negli anni successivi, quando

eventualmente vengono posizionati gli apparecchi ortodontici, queste nuove superfici di materiale contribuiscono a un enorme aumento dei livelli salivari di batteri cariogeni, come *S. mutans*. Infine negli anziani, con l'utilizzo delle protesi, possono aumentare le infezioni da *Candida spp*<sup>[53]</sup>, sebbene la letteratura mostri delle evidenze ambigue a riguardo.

È inoltre assodato che la trasmissione di batteri anaerobi, in parte parodontopatogeni, avviene durante il primo anno di vita nei bambini, dove *Veillonella spp* e *P. melaninogenica* sono stati individuati già dopo 2 mesi, mentre *A. actinomycetemcomitans* sembra essere un "colonizzatore tardivo" che emerge tra i 4 e i 7 anni<sup>[54]</sup>. Il modello di colonizzazione di questi anaerobi è influenzato anche dall'emergere della dentizione decidua nonostante queste specie non abbiano alcun impatto sulle malattie dei tessuti duri intraorali come lo smalto. Dopo la prima infanzia non sembrano esserci ulteriori cambiamenti fino alla pubertà, mentre durante la pubertà si riscontrano alterazioni riguardanti *Veillonella spp*, *Prevotella denticola* e *Prevotella melaninogenica*<sup>[55]</sup>.

**Tabella 5.** Effetto dell'eruzione dei denti sulla composizione del microbiota nei bambini<sup>[43]</sup>.

| Batterio                         | Frequenza a 3 mesi(%) | Frequenza a 32 mesi (%) |
|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| <i>Prevotella melaniogenica</i>  | 76                    | 100                     |
| <i>Prevotella non pigmentata</i> | 62                    | 100                     |
| <i>Prevotella loescheii</i>      | 14                    | 90                      |
| <i>Prevotella intermedia</i>     | 10                    | 67                      |
| <i>Prevotella denticola</i>      | Non rilevata          | 71                      |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i>   | 67                    | 100                     |
| <i>Fusobacterium spp</i>         | Non rilevata          | 71                      |
| <i>Selenomonas spp</i>           | Non rilevata          | 43                      |
| <i>Capnocytophaga spp</i>        | 19                    | 100                     |
| <i>Leptotrichia spp</i>          | 24                    | 71                      |
| <i>Campylobacter spp</i>         | 5                     | 43                      |
| <i>Eikenella corrodens</i>       | 5                     | 57                      |
| <i>Veillonella spp</i>           | 63                    | 63                      |

Infine, un problema specifico e in parte ancora trascurato è la **mucosite peri-implantare** e la peri-implantite (chiamata anche "parodontite dell'impianto"). Le superfici implantari sono colonizzate dai batteri con la stessa facilità e rapidità dei denti, tuttavia sembrano

esistere diversi modelli di colonizzazione rispetto a questi ultimi. In generale, sebbene solo pochi studi abbiano valutato il microbiota degli impianti, esso è descritto come piuttosto simile a quello della parodontite, ma con alcune differenze rilevanti, per esempio lo *Staphylococcus aureus* è più comune nella placca peri-implantare, perché tale batterio è attratto dalle superfici in titanio<sup>[43]</sup>.

### 3.6. Microbiota orale e patologie

#### 3.6.1. Carie dentale

La **carie dentale** rappresenta una delle più comuni patologie legate al biofilm e deriva dalla complessa interazione tra batteri produttori di acido e carboidrati fermentabili. L'assunzione di alti livelli di carboidrati porta spesso a un aumento della produzione di acido, a una diminuzione dell'effetto tampone della saliva e a un ambiente a basso pH. L'acidificazione del cavo orale rappresenta la causa principale dei cambiamenti fenotipici e genotipici nella microflora durante la progressione della carie; infatti, le IgA secretorie salivari e le IgG sieriche derivate dal fluido crevicolare gengivale possono influenzare lo sviluppo di un microbiota cariogeno in vari stadi dell'infezione<sup>[41]</sup>.

Lo *Streptococcus mutans* e il *Lactobacillus* sono stati oggetto di numerosi studi e considerati come patogeni specifici della carie; tuttavia in alcuni pazienti con carie questi microrganismi sono stati ritrovati in scarsa quantità o addirittura assenti<sup>[56]</sup>. Questi risultati indicano che l'inizio e la progressione delle lesioni cariose non possono essere attribuiti completamente a questi microrganismi: la carie dentale, che è una malattia essenzialmente batterica, è causata da una comunità complessa piuttosto che da un singolo patogeno.

Aas et al., ad esempio, hanno riferito che anche le specie dei generi *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococchi non-mutans*, *Actinomyces spp.* e *Atopobium spp.* svolgono un ruolo chiave nella progressione della carie<sup>[56]</sup>. Un altro studio di Gross et al. ha mostrato che i livelli di *Selenomonas*, *Neisseria*, *Streptococcus mitis* e *Propionibacterium FMA5* nelle carie di denti permanenti erano significativamente associati alla progressione della carie stessa, anche se non sono stati riscontrati ad alti livelli<sup>[57]</sup>.

Inoltre, complessivamente, oltre il 40% del microbiota presente nelle lesioni cariose è costituito da specie non ancora coltivate. In particolare, ceppi non ancora coltivati o non caratterizzati di *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e *Atopobium* sono stati aggiunti alla lista dei candidati patogeni associati a questa malattia.

Oltre ai batteri acidogeni, alcuni batteri possono produrre ammoniaca da arginina e urea e quindi aumentare il pH, partecipando così all'omeostasi del pH dei biofilm orali e moderando l'inizio e la progressione della carie.

### 3.6.2. Malattia parodontale

La **gingivite** rappresenta la forma più comune tra le patologie che colpiscono il parodonto negli adulti; essa è una malattia infiammatoria reversibile causata da una placca batterica residente che si forma sul margine gengivale. Otto taxa predominanti individuati nel microbiota della placca, in particolare *TM7*, *Leptotrichia*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Lautropia* e *Haemophilus*, sono associati alla gengivite e possono essere utili come biomarcatori<sup>[58]</sup>.

Se non controllata, però, la gengivite può progredire in **parodontite**, una malattia infiammatoria cronica irreversibile, durante la quale l'infiltrato cronico di cellule immunitarie induce la distruzione del tessuto connettivo, la proliferazione vascolare e la distruzione dell'osso alveolare<sup>[41]</sup>. Il cambiamento nella composizione della comunità microbica porta ad alterazioni nei rapporti ospite-microrganismo sufficienti a determinare un'infiammazione distruttiva e la perdita ossea.

Importanti progressi nella comprensione degli agenti infettivi delle malattie parodontali si sono verificati dopo l'introduzione di tecniche di identificazione degli acidi nucleici. I taxa batterici che si ritengono ormai strettamente associati alla malattia parodontale da studi colturali e molecolari includono *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Prevotella intermedia* e molti filotipi non ancora coltivati.

Le analisi delle comunità di biofilm batterici subgengivali in individui con diverse condizioni parodontali (salute, gengivite e parodontite) hanno rivelato la presenza di batteri provenienti da 26 phyla, 433 generi e oltre 1000 taxa: *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Synergistetes* e *Spirochete* sembrano essere i phyla più abbondanti nei soggetti con

parodontite, mentre *Firmicutes* e *Proteobacteria* dominano il microbiota rispettivamente nella gengivite e nei soggetti sani. Alti livelli di *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Fretibacterium*, *Filifactor* e *Treponema* sono presenti nei soggetti con parodontite, mentre *Streptococcus*, *Capnocytophaga*, *Leptotrichia* e *Haemophilus* prevalgono nei soggetti con gengivite<sup>[59]</sup>. Circa il 20% delle sequenze trovate nei biofilm subgengivali è legato a fenotipi non ancora coltivati e non caratterizzati.

Oltre ai batteri, nella colonizzazione subgengivale è stata rilevata la presenza di alcuni lieviti, tra cui *Candida albicans*, che sembra essere associata alla gravità della parodontite cronica. Anche gli Herpes virus, tra cui il Citomegalovirus (HCMV), l'Herpes Simplex virus (HSV) e l'Epstein-Barr virus (EBV), sono stati descritti nei biofilm subgengivali di pazienti con parodontite. Inoltre, nelle tasche parodontali sono stati rilevati alcuni archei, ma il loro ruolo nella patogenesi della malattia deve ancora essere chiarito<sup>[41]</sup>.

#### 3.6.2.1. Nuova classificazione parodontale

La nuova classificazione delle malattie parodontali e peri-implantari è il risultato del World Workshop tenutosi a Chicago nel novembre del 2017, organizzato congiuntamente dall'American Academy of Periodontology (AAP) e dall'European Federation of Periodontology (EFP). Gli obiettivi del gruppo di lavoro erano di rivisitare il precedente sistema di classificazione della parodontite, risalente al 1999, incorporando nuove conoscenze relative alla sua epidemiologia, eziologia e patogenesi, e proporre un nuovo quadro di classificazione allo scopo di facilitare lo screening e la diagnosi delle malattie parodontali e peri-implantari, promuovendo così una terapia personalizzata per il singolo paziente<sup>[60]</sup>.

Nello specifico, le forme di malattia precedentemente riconosciute come "croniche" o "aggressive" sono ora raggruppate sotto un'unica categoria, "parodontite", e sono ulteriormente suddivise sulla base di un sistema multidimensionale di stadiazione e classificazione. La **stadiazione** dipende in gran parte dalla gravità della malattia al momento della sua presentazione, ma anche dalla complessità della sua gestione, mentre il **grading** fornisce informazioni supplementari riguardo alle caratteristiche biologiche della malattia, comprendendo un'analisi del tasso di progressione della parodontite basata sull'anamnesi, la valutazione del rischio di un'ulteriore progressione, l'analisi dei possibili

esiti negativi del trattamento e la valutazione del rischio che la malattia (o il suo trattamento) possa influire negativamente sulla salute generale del paziente.

**Tabella 6.** Classificazione della parodontite basata su stadi<sup>[60]</sup>.

| Stadio della parodontite |  | Stadio I   | Stadio II  | Stadio III   | Stadio IV  |
|--------------------------|--|--|--|--|--|
| Severità                 | CAL nel punto di maggiore perdita          | 1 a 2 mm   | 3 a 4 mm   | ≥ 5 mm   | ≥ 5 mm   |
|                          | Perdita di osso visibile radiograficamente | Terzo coronale (< 15%)   | Terzo coronale (15–33%)  | Si estende alla metà o al terzo apicale della radice   | Si estende alla metà o al terzo apicale della radice   |
|                          | Perdita del dente                          | Nessun dente perso a causa della parodontite   |  | Denti persi a causa della parodontite ≤ 4  | Denti persi a causa della parodontite ≥ 5  |
| Complessità              | Locale                                     | Massima profondità di tasca ≤ 4 mm<br><br>Perdita di osso principalmente orizzontale | Massima profondità di tasca ≤ 5 mm<br><br>Perdita di osso principalmente orizzontale | In aggiunta alla complessità di grado II:<br><br>Profondità di tasca ≥ 6 mm<br><br>Perdita di osso alveolare ≥ 3 mm<br><br>Coinvolgimento o della forca di classe II e III<br><br>Moderato difetto osseo | In aggiunta alla complessità di grado III:<br><br>Necessita di riabilitazione complessa per:<br>Disfunzione masticatoria<br>Trauma occlusale secondario (mobilità dentale ≥ 2)<br><br>Severi difetti ossei<br><br>Morso collassato, affollamento, sventagliamento<br><br>Meno di 20 elementi dentali |

|   |  |   |  |  |                                   |
|---|--|---|--|--|-----------------------------------|
|   |  |   |  |  | rimasti (10 nei versanti opposti) |
| <b>Estensione e distribuzione in aggiunta allo stadio</b> |  | Per ogni stadio valutare estensione e localizzazione (< 30% dei denti interessati), generalizzata, oppure inserimento molari/incisivi |  |  |                                   |

\*CAL = perdita di attacco clinico.

**Tabella 7.** Classificazione della parodontite basata su gradi<sup>[60]</sup>.

| <b>Grado di parodontite</b>         |                                    |  | <b>Grado A<br/>Progressione<br/>lenta</b>                      | <b>Grado B<br/>Progressione<br/>moderata</b>                             | <b>Grado C<br/>Progressione<br/>rapida</b>                       |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|--|--|--|
| <b>Criteri primari</b>              | Evidenza diretta di progressione   | Dati longitudinali (perdita osso radiografica o CAL) | No perdita ossea per 5 anni                                    | < 2 mm in 5 anni   | ≥ 2 mm in 5 anni   |
|                                     | Evidenza indiretta di progressione | % osso perso/età                                     | < 0.25   | Da 0.25 a 1.0  | > 1.0  |
|                                     |                                    | Fenotipo   | Importanti depositi di biofilm ma bassi livelli di distruzione | Livelli di distruzione direttamente proporzionali ai depositi di biofilm | Livelli di distruzione eccessivi rispetto ai depositi di biofilm |
| <b>Fattori modificanti</b>          | Fattori di rischio                 | Fumo   | Non fumatore   | Fumatore < 10 sigarette/die  | Fumatore ≥ 10 sigarette/die                                      |
|                                     |                                    | Diabete  | Normoglicemia  | HbA1c < 7.0% in paziente con diabete                                     | HbA1c ≥ 7.0% in paziente con diabete                             |
| <b>Rischio di impatto sistemico</b> | Indice infiammatorio               | Alta sensibilità PCR hsCRP                           | < 1 mg/l   | Da 1 a 3 mg/l  | > 3 mg/l   |

\*CAL = perdita di attacco clinico, HbA1c = emoglobina glicata.

### 3.6.2.2. *Valutazione clinica della malattia parodontale*

Il sondaggio clinico con precisione millimetrica, mediante l'utilizzo della sonda parodontale, è un fattore indispensabile per diagnosticare la parodontite.

Poiché la malattia parodontale è principalmente di natura infiammatoria, la capacità di rilevare lesioni infiammatorie nei tessuti gengivali è essenziale per la diagnosi e il monitoraggio di modifiche dello stato gengivale.

Gli indici clinici in tale contesto si basano su caratteristiche cliniche di infiammazione e contengono componenti che possono essere valutati in modo non invasivo, mediante esame visivo (ad es. colore, consistenza, cambiamenti di forma, sanguinamento spontaneo) oppure in modo invasivo, come il sanguinamento alla stimolazione<sup>[61]</sup>.

Uno dei segni clinici di infiammazione gengivale, oltre all'essudazione di fluido dalla gengiva, è il **sanguinamento**, che si verifica a causa di frequenti micro-ulcerazioni nell'epitelio del solco gengivale/tasca parodontale. Il sanguinamento gengivale è utilizzato come parametro chiave nelle valutazioni della gengivite grazie alla sua obiettività e facilità di accesso clinico.

Sono stati proposti diversi indici gengivali in letteratura, i quali hanno fatto affidamento su uno o più dei seguenti criteri: colore gengivale (arrossamento), contorno gengivale, sanguinamento gengivale, valutazione del flusso crevicolare<sup>[62]</sup>. Queste caratteristiche cliniche possono essere valutate solo visivamente (ad es. colore, contorno, sanguinamento spontaneo) e/o in modo invasivo con l'uso di uno strumento, come nel caso del sanguinamento al sondaggio, eseguito mediante la sonda parodontale.

In particolare esistono diversi metodi per valutare il sanguinamento al sondaggio causato da infiammazione gengivale: l'Indice di sanguinamento angolato (AngBI)<sup>[63]</sup>, il Punteggio del sanguinamento angolato (AngBS)<sup>[64]</sup>, l'Indice di sanguinamento papillare (PBI)<sup>[65]</sup> e l'**Indice di sanguinamento al sondaggio** (BoP Index).

Quest'ultimo, il più utilizzato, è un indice dicotomico ("presente" o "assente") che prende in considerazione i siti che presentano sanguinamento entro 10 secondi dall'inserimento della sonda parodontale nel solco o nella tasca nei 6 aspetti di ciascun elemento (disto-vestibolare, vestibolare, mesio-vestibolare, disto-linguale, linguale, mesio-linguale). Nella valutazione del sanguinamento si predilige l'utilizzo del BoP Index perché, a differenza dei precedenti, è l'unico che va a stimolare i tessuti più profondi del solco o tasca parodontale.

Il sanguinamento al sondaggio, in particolare, rappresenta un'indicazione clinica della presenza di infiammazione localizzata al fondo del solco o tasca parodontale. Quest'infiammazione è generalmente causata dalla presenza di placca batterica, per cui tale parametro rappresenta un indicatore indiretto della presenza di placca o tartaro in sede sotto-gengivale.

Durante la raccolta dei parametri biometrici, un sito che presenta sanguinamento viene segnalato in cartella cerchiando il relativo valore della profondità di sondaggio. Al termine della compilazione della cartella clinica parodontale, è possibile calcolare l'indice percentuale di sanguinamento al sondaggio dividendo il numero di siti sanguinanti per il numero totale di siti sondati e moltiplicando il risultato per 100. Il raggiungimento di uno score < 20% rappresenta un indicatore di stabilità delle condizioni parodontali e/o peri-implantari del paziente<sup>[66]</sup>. Dopo l'utilizzo della strumentazione non chirurgica, la scomparsa del sanguinamento al sondaggio rappresenta un indicatore di successo terapeutico.

Un altro indice fondamentale nella valutazione della malattia parodontale è **la profondità di sondaggio**, che rappresenta la misura in mm, effettuata mediante sonda parodontale, della distanza tra il margine gengivale e il punto più apicale di penetrazione della sonda. Tale punto viene approssimato al fondo del solco o della tasca patologica.

La profondità di sondaggio rappresenta la valutazione clinica dell'alterazione nell'anatomia dei tessuti molli parodontali e peri-implantari spesso associata a malattia parodontale e peri-implantare. La presenza di tasche, ossia di solchi patologicamente approfonditi, costituisce infatti uno dei segni clinici principali di parodontite e peri-implantite. Generalmente la profondità di sondaggio viene rilevata su ciascuno dei 6 aspetti di ogni elemento dentale o implantare presente in arcata con una forza di 0.2 N.

In una condizione di salute parodontale la sonda si approfondisce all'interno del solco per 1–3 mm; quando questo valore risulta aumentato indica che il solco si è approfondito, divenendo una **tasca parodontale** ( $\geq 4$  mm). Un'eventuale riduzione della profondità di sondaggio dopo l'inizio della terapia rappresenta un indicatore del successo terapeutico: idealmente, dopo la terapia, le profondità di sondaggio patologiche dovrebbero rientrare entro i 3 mm<sup>[66]</sup>.

Un parametro altrettanto importante è l'**indice di placca** (PI), seppur non specifico di malattia parodontale, poiché non sempre la presenza di placca comporta alterazioni dei tessuti. Nello specifico, l'indice di placca secondo Silness & Loe<sup>[67]</sup> viene registrato, nel corso dell'esame clinico parodontale, nei 6 siti per ciascun elemento dentale presente tramite sondaggio circonferenziale con sonda parodontale manuale. Le 6 misurazioni rilevate vengono sommate e divise per 6 per ottenere il PI per singolo elemento; l'indice di placca per soggetto viene poi calcolato come media dell'indice dei singoli elementi.

- 0 – Assenza di placca;
- 1 – La placca può essere vista in situ solo dopo l'applicazione della soluzione rivelatrice o utilizzando la sonda sulla superficie del dente;
- 2 – Moderato accumulo di depositi all'interno della tasca gengivale, o sul dente e sul margine gengivale che può essere visto a occhio nudo;
- 3 – Abbondanza di depositi all'interno della tasca gengivale e/o sul dente e sul margine gengivale.

Altro metodo è quello di O'Leary<sup>[68]</sup>, in cui, attraverso l'utilizzo di un rivelatore di placca, si tinge la placca presente all'interno del cavo orale così da renderla facilmente individuabile. La superficie dei denti viene divisa in 4 parti: mesiale, distale, linguale/palatale e vestibolare. Al termine viene calcolato il rapporto tra il numero di superfici con placca e il numero di superfici totali, e assegnato un valore alla percentuale:

- 10–15% = buono
- 15–30% = medio
- > 30% = cattivo

### 3.6.3. Stomatite aftosa ricorrente

La **stomatite aftosa ricorrente** è la più comune malattia della mucosa orale e colpisce circa il 20% della popolazione generale. Tale malattia è caratterizzata da ulcere orali ricorrenti e particolarmente dolorose.

Sempre più evidenze indicano che essa è associata alla disbiosi del microbiota mucosale e salivare: Marchini et al. hanno riscontrato la presenza di *Prevotella* solo nel microbiota mucosale dei pazienti con stomatite e non nei soggetti sani<sup>[69]</sup>, Seoudi et al. hanno studiato il microbiota mucosale e hanno osservato che il phylum *Actinobacteria*, specialmente il genere *Rothia*, era rappresentato più frequentemente nei pazienti affetti rispetto ai controlli sani<sup>[70]</sup>. Un confronto dell'abbondanza relativa di ogni taxon ha rivelato diminuzioni dei microrganismi costituenti il microbiota centrale sano (ad es. *Streptococcus salivarius*) e incrementi di specie rare (ad es. *Acinetobacter johnsonii*) nel microbiota mucosale e salivare dei pazienti affetti.

### 3.6.4. Carcinoma orale

Evidenze sempre maggiori suggeriscono come il microbiota orale possa avere un ruolo nello sviluppo del **carcinoma squamocellulare orale**, il tumore maligno più noto originante dall'epidermide del cavo orale.

In uno studio sono stati esaminati il carcinoma orale e le superfici mucosali sane dello stesso paziente con metodi basati sulla coltura e si è osservato che la superficie del carcinoma orale ospitava un numero significativamente maggiore di aerobi e anaerobi<sup>[71]</sup>. Apparenti differenze nella composizione del microbiota all'interno della mucosa tumorale e non tumorale sono state riportate anche attraverso l'analisi dell'rRNA 16S: *Streptococcus sp. oral taxon 058*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*, *Johnsonella ignava* e *Streptococcus parasanguinis I* erano fortemente associati ai siti tumorali, mentre *Granulicatella adiacens* era prevalente nei siti non tumorali<sup>[72]</sup>. Un altro studio ha mostrato che la quantità di *Apnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus mitis* aumentava nella saliva di soggetti con carcinoma<sup>[47]</sup>. Più recentemente, Schmidt et al. hanno riferito che la presenza di *Firmicutes* (specialmente *Streptococcus*) e *Actinobacteria* (specialmente *Rothia*) era significativamente diminuita nei campioni tumorali rispetto ai campioni controlaterali normali dello stesso paziente<sup>[73]</sup>. Lee et al., infine, hanno

dimostrato che la composizione del microbioma orale di cinque generi, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, e *Slackia*, rivelava differenze significative tra la lesione epiteliale precursore e la lesione cancerosa<sup>[74]</sup>. Queste differenze osservabili nel microbioma orale potrebbero potenzialmente essere utili come biomarcatori per monitorare lo sviluppo, la progressione e la recidiva del carcinoma orale.

Il ruolo del microbiota locale nella patogenesi dei tumori orali, tuttavia, non è ancora ben definito. Sono stati ipotizzati diversi meccanismi: in primo luogo, i batteri potrebbero provocare risposte infiammatorie croniche; i mediatori infiammatori prodotti in questo processo potrebbero causare o facilitare la proliferazione cellulare, la mutagenesi, l'attivazione degli oncogeni e l'angiogenesi. In secondo luogo, i batteri potrebbero influenzare direttamente la patogenesi dei tumori attraverso la secrezione di proteine effettrici utilizzando sistemi di secrezione di tipo 3 o 4, che potrebbero influenzare la proliferazione cellulare, i riarrangiamenti citoscheletrici, l'attivazione di NF-KB e l'inibizione dell'apoptosi cellulare. Infine, alcune sostanze cancerogene potrebbero essere prodotte dai batteri stessi, come nel caso della conversione batterica dell'etanolo in acetaldeide, cancerogeno noto<sup>[41]</sup>.

### 3.6.5. Diabete

È ormai noto che esiste una relazione bidirezionale tra il **diabete** e la **parodontite**; quest'ultima è considerata una delle complicanze del diabete non controllato<sup>[41]</sup>.

Diversi studi hanno esplorato l'effetto del diabete sul microbiota orale: uno di questi ha riportato che la placca sopragengivale dei soggetti diabetici mostrava livelli più alti di *T. denticola*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus intermedius* rispetto a quella dei soggetti non diabetici, ma non erano state riscontrate differenze significative nei livelli di microrganismi nella saliva, nel risciacquo orale e nella placca sottogengivale tra soggetti diabetici e non diabetici<sup>[75]</sup>. Un altro studio, invece, ha rilevato una differenza significativa nel microbiota sottogengivale tra soggetti diabetici e non diabetici: i primi avevano livelli più alti di *TM7*, *Aggregatibacter*, *Neisseria*, *Gemella*, *Eikenella*, *Selenomonas*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Streptococcus* e livelli più bassi di *Porphyromonas*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Synergistetes*, *Tannerella* e *Treponema*<sup>[76]</sup>.

Inoltre, i batteri associati alla parodontite possono determinare un peggioramento del controllo glicemico: il lipopolisaccaride prodotto da *P. gingivalis*, uno dei principali patogeni della parodontite, potrebbe mediare l'insulino-resistenza e compromettere l'attività insulinica stimolando la produzione di alcune citochine pro-infiammatorie. Inoltre, le infezioni batteriche possono ridurre l'assorbimento del glucosio mediato dall'insulina nel muscolo scheletrico e determinare un'insulino-resistenza. In questo senso, il trattamento antimicrobico nelle tasche parodontali sembra essere efficace nel migliorare il controllo glicemico nei diabetici, probabilmente attraverso la diminuzione del livello sierico di TNF- $\alpha$  e l'attenuazione appunto della resistenza all'insulina mediata dai meccanismi di cui sopra<sup>[41]</sup>.

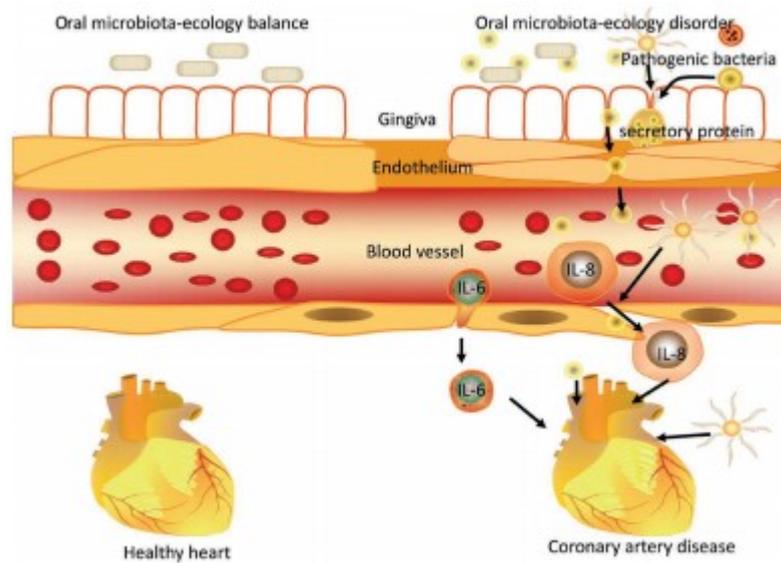
### 3.6.6. Malattie cardiovascolari

Il microbiota orale rappresenta un importante fattore di rischio per le **malattie cardiovascolari**, che sono state associate ai patogeni parodontali. Uno studio, infatti, ha dimostrato che la presenza elevata di *Veillonella* e *Streptococcus* nelle placche aterosclerotiche era associata alla loro abbondanza nel cavo orale<sup>[77]</sup>. Alcuni microrganismi orali, tra cui *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, e *Campylobacter rectus* sono stati rilevati nelle placche aterosclerotiche<sup>[78]</sup>. Analogamente, sono stati rilevati *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. denticola* nei trombi di pazienti con infarto miocardico acuto mediante PCR, indicando che il microbiota orale potrebbe essere coinvolto nell'infiammazione e nell'instabilità della placca aterosclerotica<sup>[79]</sup>.

È interessante notare, poi, come alcuni microrganismi del cavo orale siano correlati a marcatori di malattie cardiovascolari: lo *Streptococco* è correlato positivamente con il colesterolo HDL e l'ApoA1 (componente principale delle HDL), mentre la *Neisseria* è correlata negativamente con gli stessi marcatori. Inoltre, la presenza elevata di *Fusobacterium* è correlata positivamente al colesterolo LDL e al colesterolo totale<sup>[77]</sup>.

Sono stati ipotizzati diversi meccanismi per spiegare la relazione tra parodontite e malattie cardiovascolari. In generale, la risposta dell'ospite nei confronti dell'esposizione prolungata ai patogeni parodontali sembra essere un fattore importante; il microrganismo accede al sistema circolatorio attraverso il tessuto gengivale danneggiato e si fa strada fino alle

arterie, dove secerne lipopolisaccaridi e mediatori pro-infiammatori (ad es. IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), provocando complicanze cardiovascolari, come lesioni endoteliali vascolari, aggregazione piastrinica, proliferazione della muscolatura liscia e deposizione di lipidi<sup>[77]</sup>.



**Figura 5.** Possibile associazione tra batteri del cavo orale e malattia coronarica<sup>[80]</sup>.

### 3.7. Modulazione del microbiota orale

Visto il ruolo dei microrganismi del cavo orale nell'eziologia e nella patogenesi delle malattie orali e sistemiche, è fondamentale migliorare la protezione orale contro i patogeni e mantenere l'equilibrio dinamico del microbiota. A questo scopo, è importante comprendere le interazioni tra le diverse comunità microbiche in tale contesto: un potenziale patogeno potrebbe essere escluso se i recettori di adesione non sono disponibili o se non sono presenti batteri indispensabili per la cooperazione metabolica, sia nell'utilizzo dei nutrienti che nella gestione ambientale.

La coesistenza di determinati gruppi di microrganismi conferisce una maggiore virulenza e un rischio maggiore di sviluppo di malattie orali e sistemiche. D'altra parte, alcuni microrganismi specifici come *P. gingivalis*, definito come patogeno chiave, possono modificare l'ambiente per alterare le proporzioni di altri microrganismi all'interno della nicchia ecologica<sup>[41]</sup>.

### 3.7.1. Rimozione meccanica

Le terapie attuali sono orientate principalmente a ridurre il numero di microrganismi patogeni con metodi meccanici. La **rimozione autonoma della placca** attraverso lo spazzolamento, infatti, sembrerebbe contribuire a migliorare il controllo della placca. Allo stesso modo, la **rimozione professionale della placca**, compresa l'ablazione del tartaro e la chirurgia parodontale, riduce il numero e la proporzione di batteri patogeni e ristabilisce l'equilibrio ecologico del microbiota orale<sup>[41]</sup>. A riprova di ciò, in uno studio di Sakamoto et al. i patogeni parodontali, come *P. gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *T. denticola* e *Treponema socranskii*, erano notevolmente diminuiti nei pazienti con parodontite dopo la rimozione meccanica<sup>[81]</sup>. Tuttavia, la complessità dell'anatomia del dente e le limitazioni dell'area operativa possono determinare difficoltà nella rimozione completa della placca. I mezzi meccanici sono inoltre aspecifici, per cui spesso vengono rimossi anche i batteri non patogeni; di conseguenza la ricchezza microbica e la biodiversità possono risultare significativamente diminuite dopo la rimozione meccanica, il che è negativo per la salute orale da un certo punto di vista.

### 3.7.2. Utilizzo di antibiotici

Gli **antibiotici** sono farmaci utilizzati contro specifici batteri patogeni negli animali e nell'uomo. Le indicazioni per l'uso di antibiotici in odontoiatria sono limitate perché la maggior parte delle patologie orali è meglio gestita da interventi operativi e misure di igiene orale. Quando, però, vengono utilizzati, solitamente l'uso locale è preferito alla somministrazione sistemica perché garantisce una concentrazione di farmaco notevolmente aumentata e sostenuta nel fluido crevicolare, così come una riduzione degli effetti collaterali sistemici<sup>[41]</sup>.

In generale gli antibiotici sono utilizzati come coadiuvanti della terapia meccanica per trattare la parodontite, in particolare nei casi di fallimento del trattamento convenzionale e nelle malattie più aggressive. Quando i trattamenti manuali sono integrati con l'uso di antibiotici locali e sistemici, il cavo orale subisce un cambiamento nella composizione e nella concentrazione dei batteri. Uno studio ha riferito che gli antibiotici amoxicillina e metronidazolo, in seguito ad ablazione del tartaro, mostravano parametri parodontali significativamente migliori e riducevano i livelli di *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythensis*<sup>[82]</sup>. Un altro studio ha valutato l'effetto della terapia parodontale sulla

composizione del microbiota subgengivale e ha osservato che tutte le specie del complesso rosso e 9 delle 12 specie del complesso arancione erano significativamente ridotte a 12 mesi nei soggetti che ricevevano antibiotici per via sistemica<sup>[83]</sup>.

Tuttavia, va sottolineato che l'uso di antibiotici nella pratica odontoiatrica si caratterizza per una prescrizione empirica basata su fattori epidemiologici clinici e batteriologici, con conseguente uso di una gamma molto ristretta di antibiotici ad ampio spettro per un breve periodo. Questa procedura ha portato allo sviluppo di antibiotico-resistenza in una vasta gamma di batteri e alla conseguente inefficacia degli antibiotici comunemente utilizzati<sup>[41]</sup>. Un uso efficace degli antibiotici potrebbe richiedere l'analisi genomica del microbioma orale del paziente per identificare i microrganismi presenti e determinarne così la risposta a trattamenti specifici.

### 3.7.3. Probiotici e prebiotici

Per superare i limiti dei metodi di intervento tradizionali, sono state sviluppate nuove strategie come l'utilizzo di probiotici e prebiotici.

I **probiotici** sono ben noti nell'ambito della promozione della salute e sono stati ampiamente studiati. Essi sono definiti dall'International Scientific Association come "microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite" e si presume che il loro meccanismo d'azione nel cavo orale sia simile a quello osservato in altre parti del corpo<sup>[41]</sup>. In particolare, si pensa che gli organismi probiotici agiscano principalmente attraverso:

- Competizione con i potenziali patogeni per i nutrienti o i siti di adesione;
- Uccisione o inibizione della crescita dei patogeni attraverso la produzione di batteriocine o altri prodotti;
- Miglioramento dell'integrità della barriera intestinale e stimolazione della produzione di mucina;
- Modulazione della proliferazione e dell'apoptosi cellulare;
- Stimolazione e modulazione del sistema immunitario della mucosa.

Tuttavia, i probiotici nel cavo orale devono rispettare alcuni requisiti specifici, in particolare devono essere in grado di aderire e colonizzare i tessuti orali, comprese le superfici dure e non scivolose, e diventare parte del biofilm; inoltre non devono fermentare

gli zuccheri, altrimenti determinerebbero una riduzione del pH con conseguente aumento del rischio di carie.

L'utilizzo dei probiotici è stato studiato per il trattamento della carie, principalmente interferendo con la colonizzazione orale dei patogeni cariogeni. Näse et al. sono stati i primi a testare la capacità del *L. rhamnosus* GG di inibire la carie in vivo e hanno osservato un numero inferiore di carie dentali e di *S. mutans* nel gruppo testato<sup>[84]</sup>. Oltre a *L. rhamnosus*, è stato dimostrato che anche *Bifidobacterium*, *Lactobacillus reuteri*, *B. animalis*, *L. paracasei* e *Lactobacillus casei* sono in grado di diminuire il numero di batteri cariogeni e quindi prevenire la carie dentale<sup>[41]</sup>. Al contrario, alcuni dei batteri menzionati non hanno mostrato alcun impatto significativo sui profili microbici o sui livelli di batteri associati alla carie in alcuni studi. Lexner et al., ad esempio, hanno indicato che un'assunzione giornaliera a breve termine di latte integrato con *L. rhamnosus* LB21 non ha influenzato significativamente i profili microbici nella saliva e nei campioni di placca supragengivale raccolti da adolescenti con carie<sup>[85]</sup>. In un altro studio, il *Bifidobacterium animalis* presente nello yogurt non riduceva i livelli di *S. mutans* e *Lactobacilli* salivari nei bambini<sup>[86]</sup>. Allo stesso modo, la somministrazione orale quotidiana di *L. reuteri* non sembra ridurre i livelli o ritardare la ricrescita di *S. mutans*<sup>[87]</sup>.

Ci sono diverse possibili ragioni per tali risultati discrepanti. In primo luogo, la durata della terapia probiotica, il tempo di follow-up, la dose e la modalità di applicazione sono diversi. Secondariamente, la maggior parte degli studi si è limitata agli endpoint microbiologici piuttosto che a quelli della carie. In ogni caso, una recente meta-analisi di 50 trial controllati randomizzati ha dimostrato che le prove attuali sono insufficienti per raccomandare i probiotici per la gestione della carie dentale<sup>[88]</sup>, pertanto sono necessari ulteriori studi per valutarne l'efficacia e la sicurezza.

Un numero crescente di studi, inoltre, sostiene il ruolo della terapia probiotica per prevenire o trattare la gengivite e la parodontite. Krasse et al., ad esempio, hanno riferito che il consumo di gomme da masticare contenenti *L. reuteri* potrebbe diminuire il sanguinamento gengivale e ridurre la gengivite<sup>[89]</sup>. *L. reuteri* è stato ulteriormente valutato da Iniesta et al. in un caso di gengivite, riscontrando una riduzione della conta di *P. gingivalis* nel microbiota subgengivale ma nessun impatto sui parametri della gengivite<sup>[90]</sup>. Nella parodontite *L. reuteri* potrebbe diminuire l'indice di infiammazione gengivale,

l'indice di placca, la profondità della tasca di sondaggio e il livello di attacco clinico e ridurre i livelli dei patogeni parodontali *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*<sup>[41]</sup>. Inoltre, anche *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* e alcune specie di *Bacillus* sono stati valutati come probiotici per le malattie parodontali, alcuni dei quali hanno ottenuto un miglioramento delle condizioni parodontali.

I **prebiotici**, invece, sono oligosaccaridi scarsamente digeriti che possono stimolare la crescita e l'attività dei batteri benefici e contemporaneamente inibire la crescita e l'attività dei batteri potenzialmente dannosi. Inoltre, contribuiscono a migliorare la funzione di barriera della mucosa, l'immunità dell'ospite e ad aumentare la produzione di acidi grassi a catena corta<sup>[41]</sup>. Lattosio, inulina, fruttoligosaccaridi, galatto-oligosaccaridi e xiloligosaccaridi sono alcuni tra i prebiotici comunemente utilizzati per la modulazione del microbiota intestinale, mentre gli studi sui prebiotici utilizzati nel contesto del cavo orale sono estremamente limitati. Gli zuccheri e la fibra alimentare, infatti, considerati prebiotici per i batteri lattici intestinali, non risultano adatti all'ambiente orale. Alcuni potenziali prebiotici orali come lo xilitolo, lo xilosio e l'arabinosio potrebbero sopprimere la crescita dello *Streptococcus mutans*, ma sono stati utilizzati anche per la crescita di alcuni ceppi di lactobacilli<sup>[41]</sup>.

Un numero sempre maggiore di studi sta tuttavia cercando di identificare nuovi prebiotici. In uno di questi, in particolare, alcuni microrganismi orali come *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. fermentum* e bifidobatteri sembravano maggiormente prevalenti nell'ecosistema orale sano<sup>[91]</sup>, per cui un approccio prebiotico allo scopo di promuovere la crescita di questi microrganismi potrebbe promuovere anche la salute parodontale.

I probiotici e i prebiotici potrebbero essere quindi potenzialmente efficaci per prevenire e curare le malattie causate da batteri, perché possono ristabilire un equilibrio ecologico o recuperare la biodiversità del microbiota orale nelle sue fasi iniziali. Tuttavia, è importante comprendere le interazioni tra il microbioma orale e i probiotici, nonché l'esatta modalità d'azione di queste sostanze/microrganismi nel contesto del cavo orale.

## **CAPITOLO 4.**

### **PROTOCOLLO DI RICERCA**

Lo scopo di questa tesi è quello di proporre, per la prima volta sull'uomo, un protocollo di ricerca per la valutazione del ruolo degli esosomi derivanti dallo zenzero nella modulazione del microbiota orale, con particolare riferimento al potenziale ruolo al livello del parodonto.

#### **4.1. Introduzione e razionale**

Negli ultimi anni il numero di studi relativi alle vescicole extracellulari note come esosomi è cresciuto notevolmente. Tali vescicole, che possono prendere parte a diversi meccanismi fisiologici<sup>[1]</sup>, stanno attirando un crescente interesse per il loro potenziale effetto terapeutico<sup>[3]</sup>. In questo contesto, un ruolo sempre più importante è quello degli esosomi presenti negli alimenti. Essi possiedono un'alta biocompatibilità e permettono una produzione su larga scala.

Sempre più evidenze scientifiche, infatti, suggeriscono che le nanovesicole di origine vegetale possano entrare nelle cellule dei mammiferi ed influenzare in tal modo la loro espressione genica: l'RNA contenuto al loro interno sembra capace di sopravvivere nella forma attiva negli animali e modulare così i processi cellulari dell'ospite tramite cross-talk genetico. Ciò suggerisce una potenziale applicazione medica di queste nanoparticelle nella regolazione dei processi biologici fondamentali del corpo umano.

Attualmente, le nanovesicole di origine vegetale hanno mostrato attività promettenti nella regolazione del sistema immunitario con attività antinfiammatorie e antitumorali, nella rigenerazione dei tessuti e nel trasporto di farmaci e acidi nucleici<sup>[2,14,17,18,19]</sup>. Inoltre, rispetto ai sistemi di trasporto dei farmaci attualmente disponibili, esse presentano molteplici vantaggi, tra cui la bassa immunogenicità e la stabilità nel tratto gastrointestinale<sup>[17]</sup>.

Le malattie infiammatorie croniche coinvolgono spesso un gran numero di fattori di virulenza che colpiscono diversi aspetti dell'ospite<sup>[92]</sup>. Lo sviluppo di una strategia

terapeutica efficace che possa inibire questa pluralità di fattori di virulenza senza causare effetti collaterali richiede un cambiamento dall'attuale utilizzo di singoli agenti terapeutici all'impiego di un insieme di agenti terapeutici che possano colpire contemporaneamente più fattori di virulenza<sup>[93]</sup>. Tuttavia, non esiste un vettore ideale per la somministrazione di farmaci che possa colpire selettivamente gli organismi patogeni e trasportare più agenti terapeutici senza causare tossicità.

È ormai noto che le nanoparticelle simili ad esosomi derivate da piante commestibili, composte da un gran numero di lipidi, RNA (tra cui miRNA) e proteine<sup>[9,32]</sup>, possano prevenire/trattare alcune malattie infiammatorie croniche; tuttavia, il meccanismo cellulare e molecolare alla base di tale effetto terapeutico non è noto. Poiché tali nanovesicole trasportano naturalmente un gran numero e varietà di molecole, si ipotizza che, al momento del legame tra queste e gli agenti infettivi, le molecole presenti possano colpire più fattori di virulenza contemporaneamente e prevenire così lo sviluppo della malattia.

In particolare, Sundaram et al. hanno valutato come le nanovesicole dello zenzero possano essere applicate per trattare/prevenire le malattie infettive orali che sono all'origine, nel lungo periodo, di una delle condizioni più diffuse nella popolazione generale, la parodontite cronica<sup>[36]</sup>. I risultati di tale studio, effettuato esclusivamente su modelli murini di malattia parodontale, suggeriscono che le nanovesicole dello zenzero sono selettivamente captate dal *Porphyromonas gingivalis*, un anaerobio Gram-negativo, importante patogeno nella parodontite cronica, portando a una riduzione della patogenicità del microrganismo. I processi patogeni influenzati, in particolare, includono la crescita, l'adesione, l'ingresso e la proliferazione dello stesso nelle cellule dell'ospite, con conseguente riduzione della virulenza.

Ad oggi, tuttavia, non esistono studi in letteratura che abbiano indagato se tale meccanismo è evidenziabile anche nell'uomo e se gli esosomi derivanti dallo zenzero possano modulare il microbiota orale umano, costituito da molteplici specie che agiscono in maniera sinergica nella patogenesi della malattia parodontale.

## **4.2. Titolo dello studio**

Lo studio proposto sarà un trial clinico randomizzato prospettico a doppio cieco per valutare il ruolo degli esosomi dello zenzero nella modulazione del microbiota orale in pazienti affetti da parodontite.

## **4.3. Obiettivi dello studio**

Gli obiettivi primari dello studio saranno:

1. Valutare l'effetto della somministrazione di nanovesicole esosomiali derivanti dallo zenzero sulla salute del cavo orale nei soggetti affetti da malattia parodontale;
2. Valutare l'effetto della somministrazione di nanovesicole esosomiali derivanti dallo zenzero sul microbiota orale in soggetti affetti da malattia parodontale.

## **4.4. Disegno dello studio**

Sarà adottato un disegno di studio clinico unicentrico prospettico, controllato e randomizzato.

Il numero di pazienti verrà stabilito attraverso l'analisi statistica della dimensione campionaria. Lo studio sarà condotto secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki, previa approvazione da parte del comitato etico locale. In base al Regolamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 aprile 2016, saranno garantiti i seguenti requisiti relativi ai dati personali: pseudonimizzazione e crittografia, riservatezza, integrità, disponibilità e resilienza dei sistemi e servizi di trattamento, capacità di ripristinare la disponibilità e l'accesso dei dati in caso di incidente fisico o tecnico. Il consenso informato sarà ottenuto da tutti i partecipanti.

I criteri di inclusione riguarderanno: (1) patologia parodontale accertata; (2) assenza di patologie concomitanti; (3) età maggiore di 18 anni. I criteri di esclusione riguarderanno: (1) pazienti con condizioni generali di salute compromesse; (2) pazienti sottoposti a radioterapia; (3) pazienti in trattamento con farmaci; (4) assenza di malattia parodontale; (5) utilizzo di antibiotici nel mese precedente all'inizio della sperimentazione; (6) utilizzo di probiotici e prebiotici nel mese precedente all'inizio della sperimentazione; (7) introduzione durante la sperimentazione di ulteriori trattamenti per la cura della malattia parodontale.

#### **4.5. Selezione del campione**

In occasione del primo controllo odontoiatrico (T0), eseguito da un clinico esperto in patologia orale, verrà effettuata una approfondita anamnesi e una valutazione della salute parodontale, basata sui seguenti parametri:

1. Stadio e grado della malattia parodontale secondo la classificazione del World Workshop 2017;
2. Indice di placca batterica, calcolato secondo lo score di Silness & Løe e di O'Leary;
3. Sanguinamento al sondaggio, calcolato attraverso l'Indice di sanguinamento al sondaggio (BoP Index);
4. Profondità di sondaggio, valutato in millimetri.

I soggetti verranno classificati in una variabile dicotomica: senza parodontite o affetti da parodontite cronica (sia localizzata che generalizzata). I pazienti senza parodontite saranno esclusi, mentre quelli con parodontite verranno suddivisi in base al grado. La gravità della parodontite sarà caratterizzata dalla quantità di perdita di attacco clinico, definita come la perdita del tessuto connettivo di supporto intorno ai denti (parodontite lieve = 1–2 mm, parodontite moderata = 3–4 mm, parodontite grave  $\geq 5$  mm).

Lo studio verrà condotto in doppio cieco dividendo i pazienti selezionati secondo i criteri di inclusione ed esclusione tra un gruppo di trattamento (GT) e un gruppo di controllo (GC).

Le seguenti analisi verranno effettuate prima del trattamento (T0):

- Valutazione degli indici parodontali;
- Valutazione salivare;
- Valutazione del microbiota parodontale.

Le visite odontoiatriche saranno ripetute a cadenza mensile per un lasso di tempo di almeno 3 mesi (T1, T2, T3), e ad ognuna di esse si ripeteranno le valutazioni eseguite a T0.

#### **4.6. Trattamento**

##### *Isolamento delle nanoparticelle esosomiali dello zenzero*

Lo zenzero sarà acquistato in un supermercato locale, lavato con tampone fosfato salino sterile (PBS) e sottoposto a rimozione della buccia. Successivamente sarà macinato in un frullatore per ottenerne il succo e filtrato per rimuovere le particelle più grandi.

Il succo ottenuto sarà centrifugato in sequenza a 1000x g per 10 minuti, 3000x g per 20 minuti e 10.000x g per 40 minuti, allo scopo di rimuovere ancora le particelle. Il surnatante verrà a sua volta centrifugato a 150.000x g per 2 ore, il pellet sarà risospeso in PBS sterile, trasferito in un gradiente di saccarosio (8%-15%-30%-45%-60%) e sottoposto a centrifugazione a 150.000x g per 2 ore a 4°C. Le bande tra lo strato 8%–30% e lo strato 30%–45% saranno raccolte separatamente e costituiranno le nanoparticelle esosomiali di interesse. Gli esosomi purificati saranno quindi fissati con paraformaldeide al 2% e visibili con microscopia elettronica.

##### *Trattamento*

Verrà somministrata una dose di collutorio contenente nanovesicole esosomiali dello zenzero al gruppo GT; mentre al gruppo GC sarà somministrato un collutorio placebo.

#### **4.7. Valutazione salivare**

I pazienti saranno informati e supervisionati da un'infermiera qualificata durante la raccolta della saliva. Saranno istruiti ad astenersi dal mangiare o bere (ad eccezione dell'acqua) 2 ore prima della raccolta della saliva per ridurre al minimo i possibili residui di cibo e la stimolazione della produzione di saliva. La valutazione salivare avverrà prima del trattamento e a termine del trattamento.

I campioni saranno raccolti la mattina tra le 9:00 e le 11:00, durante i giorni feriali, per ridurre al minimo le variazioni circadiane dei biomarcatori salivari. Per ciascun campione sarà raccolto un singolo campione di saliva totale non stimolato di 1 minuto attraverso uno specifico metodo di raccolta standardizzato chiamato Salivette® (SARSTEDT). La saliva sarà prelevata masticando un tampone a forma di rotolo per 45 secondi per stimolare la salivazione. Quindi il tampone con la saliva assorbita sarà riportato nella Salivette.

La centrifugazione per 2 minuti a 1000x g produrrà un campione di saliva trasparente nella provetta conica del dispositivo Salivette. Dopo la raccolta, i campioni saranno conservati a -80°C.

La concentrazione salivare delle citochine sarà analizzata mediante un kit Multi-Analyte Array (kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokines Multi-Analyte ELISArray™, Qiagen). Le immunoassorbance di IL1 $\beta$ , IL6, TGF- $\beta$ 1, IL8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL17A, IL4, IL10, MCP-1, Mip-1a, Mip-1b saranno analizzate secondo il protocollo standard del produttore. I valori di assorbanza tipici dovrebbero variare da 0.00 a 2.50. I valori di assorbanza maggiori di 2.50 non rientrano nell'intervallo lineare del dosaggio. Valori di assorbanza negativi indicano l'assenza della citochina/chemochina testata.

#### **4.8. Valutazione del microbiota parodontale**

Verrà eseguito un prelievo a livello parodontale che sarà sottoposto ad un'analisi microbiologica tramite Next Generation Sequencing (NGS), in modo tale da ottenere una valutazione del microbiota orale del paziente affetto da parodontite prima e dopo il trattamento.

#### **4.9. Conclusioni**

Tale protocollo di ricerca consentirà di approfondire le conoscenze scientifiche riguardo ad una potenziale nanomedicina che sta suscitando un crescente interesse negli ultimi anni, in un campo ancora poco esplorato rappresentato dal ruolo dello zenzero nella modulazione del microbiota orale e, di conseguenza, nella salute del cavo orale. Ciò potrebbe aprire la strada per futuri progetti nel medesimo ambito e avere successivi risvolti nella pratica clinica, in particolare nel campo della malattia parodontale, alla cui patogenesi concorre attivamente il microbiota orale. La possibilità di utilizzare agenti terapeutici che possano mirare a diversi fattori di virulenza nell'ospite, senza il rischio di effetti collaterali, infatti, potrebbe rappresentare un punto di svolta nel trattamento della malattia parodontale.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 2006; 107: 102–8.
- [2] Zhang M, Viennois E, Xu C, Merlin D. Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases. *Tissue Barriers*. 2016; 4: e1134415.
- [3] Braicu C, Tomuleasa C, Monroig P et al. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death Differ* 2015; 22: 34-45.
- [4] Plantz PE, Patton S, Keenan TW. Further evidence of plasma membrane material in skim milk. *J Dairy Sci*. 1973; 56: 978-83.
- [5] T, Murakami K, Nakatani H et al. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 396: 528-33.
- [6] Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett*. 2016; 371: 48-61.
- [7] Pieters BC, Arntz OJ, Bennink MB et al. Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF- $\beta$ . *PLoS One*. 2015; 10: e0121123.
- [8] Regente M, Pinedo M, Elizalde M, de la Canal L. Apoplatic exosome like vesicles: A new way of protein secretion in plants? *Plant Signal. Behav*. 2012; 7: 544–6.
- [9] Mu J, Zhuang X, Wang Q et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Mol. Nutr. Food Res*. 2014; 58: 1561–73.
- [10] Zhao Z, Yu S, Li M, Gui X, Li P. Isolation of exosome-like nanoparticles and analysis of microRNAs derived from coconut water based on small RNA high-throughput sequencing. *J Agric Food Chem*. 2018; 66: 2749–57.
- [11] Zhuang X, Deng ZB, Mu J et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 28713.

- [12] Di Gioia S, Hossain MN, Conese M. Biological properties and therapeutic effects of plant-derived nanovesicles. *Open Med (Wars)*. 2020; 15:1096-1122.
- [13] Raimondo S, Giavaresi G, Lorico A, Alessandro R. Extracellular vesicles as biological shuttles for targeted therapies. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 1848.
- [14] Zhang M, Xiao B, Wang H et al. Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy. *Mol Ther*. 2016; 24:1783–96.
- [15] Kim SM, Kim HS. Engineering of extracellular vesicles as drug delivery vehicles. *Stem Cell Investig*. 2017; 4: 74.
- [16] Siontorou CG, Nikoleli GP, Nikolelis DP, Karapetis SK. Artificial lipid membranes: past, present, and future. *Membr*. 2017; 7: 38.
- [17] Yang C, Zhang M, Merlin D. Advances in plant-derived edible nanoparticle-based lipid nano-drug delivery systems as therapeutic nanomedicines. *J Mater Chem B*. 2018; 6: 1312–21.
- [18] Ju S, Mu J, Dokland T et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Mol Ther*. 2013; 21: 1345–57.
- [19] Zhang M, Viennois E, Prasad M et al. Edible ginger-derived nanoparticles: a novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials*. 2016; 101: 321–40.
- [20] Wang B, Zhuang X, Deng ZB et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Mol Ther*. 2014; 22: 522–34.
- [21] Raimondo S, Naselli F, Fontana S et al. Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*. 2015; 6: 19514–27.
- [22] Irvani S, Varma RS. Plant-derived edible nanoparticles and miRNAs: emerging frontier for therapeutics and targeted drug-delivery. *ACS Sustain Chem Eng*. 2019; 7: 8055–69.

- [23] Xiao J, Feng S, Wang X et al. Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables. *PeerJ*. 2018; 6: e5186.
- [24] Chen X, You Z, Yu J. Exosome-like nanoparticles from ginger rhizomes inhibited NLRP3 inflammasome activation. *Mol Pharm*. 2019; 16: 2690–9.
- [25] Deng Z, Rong Y, Teng Y et al. Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMP-activated protein kinase. *Mol Ther*. 2017; 25: 1641–54.
- [26] Baldini N, Torreggiani E, Roncuzzi L et al. Exosome-like nanovesicles isolated from citrus limon L. Exert antioxidative effect. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018; 19: 877–85.
- [27] Zhang M, Wang X, Han M et al. Oral administration of ginger-derived nanolipids loaded with siRNA as a novel approach for efficient siRNA drug delivery to treat ulcerative colitis. *Nanomedicine (Lond)* 2017; 12: 1927–43.
- [28] Ding S, Xu S, Ma Y et al. Modulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasomes in diabetes. *Biomolecules* 2019; 9: 850.
- [29] Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol*. 2010; 11: 889–96.
- [30] Cao M, Yan H, Han X et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth. *J. ImmunoTher. Cancer* 2019; 7: 326.
- [31] Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 36-48.
- [32] Wang QL, Zhuang XY, Mu JY et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids (vol 4, 1867, 2013). *Nat Commun* 2013; 4: 1867.
- [33] Teng Y, Mu J, Hu X et al. Grapefruit-derived nanovectors deliver miR-18a for treatment of liver metastasis of colon cancer by induction of M1 macrophages. *Oncotarget* 2016; 7: 25683–97.
- [34] Chen F, Wen Q, Jiang J et al. Could the gut microbiota reconcile the oral bioavailability conundrum of traditional herbs? *J. Ethnopharmacol*. 2016; 179: 253–64.

- [35] Teng Y, Ren Y, Sayed M et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 2018; 24: 637–52.e8.
- [36] Sundaram K, Miller DP, Kumar A et al. Plant-derived exosomal nanoparticles inhibit pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*. *iScience* 2019; 21: 308–27.
- [37] Wang Q, Ren Y, Mu J et al. Grapefruit-derived nanovectors use an activated leukocyte trafficking pathway to deliver therapeutic agents to inflammatory tumor sites. *Cancer Res.* 2015; 75: 2520–9.
- [38] Zhuang X, Teng Y, Samykutty A et al. Grapefruit-derived nanovectors delivering therapeutic miR17 through an intranasal route inhibit brain tumor progression. *Mol Ther.* 2016; 24: 96–105.
- [39] Yu L, Deng Z, Liu L et al. Plant-Derived Nanovesicles: A Novel Form of Nanomedicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8: 584391.
- [40] Dewhirst FE, Chen T, Izard J et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010; 192: 5002–17.
- [41] Zhang Y, Wang X, Li H et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother.* 2018; 99: 883-93.
- [42] Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000713.
- [43] Arweiler NB, Netuschil L. The oral microbiota. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 902: 45-60.
- [44] Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J. Clin. Periodontol.* 2003; 30: 644–54.
- [45] Keijser BJB, Zaura E, Huse SM et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J. Dent. Res.* 2008; 87: 1016–20.
- [46] Almstahl A, Wikstrom M, Stenberg I et al. Oral microbiota associated with hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol. Immunol.* 2003; 18: 1–8.

- [47] Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM et al. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J. Transl. Med.* 2005; 3: 27.
- [48] Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 558–63.
- [49] Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 3770–83.
- [50] Tanner A, Maiden MFJ, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 85–98.
- [51] Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. *J Med Microbiol* 1991; 35: 5–11.
- [52] Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993; 72: 37–45.
- [53] Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont* 2011; 20: 251–60.
- [54] Könönen E. Oral colonization by anaerobic bacteria during childhood: role in health and disease. *Oral Dis* 1999; 5: 278–85.
- [55] Moore WEC, Burmeister JA, Brooks CN et al. Investigation of the influences of puberty, genetics, and environment on the composition of subgingival periodontal floras. *Infect Immun* 1993; 61: 2891–8.
- [56] Aas JA, Griffen AL, Dardis SR et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 1407–17.
- [57] Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 4121–8.
- [58] Huang S, Yang F, Zeng X et al. Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis. *BMC Oral Health* 2011; 11: 33.

- [59] Park OJ, Yi H, Jeon JH et al. Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions. *J Dent Res* 2015; 94: 921–7.
- [60] Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018; 89 Suppl 1: 173-82.
- [61] Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 37-215.
- [62] Nawbrun E. Indices to measure gingival bleeding. *J Periodontol.* 1996; 67: 555-61.
- [63] Van der Weijden GA, Timmerman MF, Nijboer A et al. Comparison of different approaches to assess bleeding on probing as indicators of gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 589-94.
- [64] Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C et al. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of “high-responder” and “low-responder” subjects. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 239-52.
- [65] Saxer UP, Mühlemann HR. Motivation and education. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd.* 1975; 85: 905-19.
- [66] L. Trombelli. *Strumentazione Parodontale Non Chirurgica.* Masson; 2005.
- [67] Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* 1964; 22: 121-35.
- [68] O’Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol.* 1972; 43: 38.
- [69] Marchini L, Campos MS, Silva AM et al. Bacterial diversity in aphthous ulcers. *Oral Microbiol. Immunol.* 2007; 22: 225–31.
- [70] Seoudi N, Bergmeier LA, Drobniewski F et al. The oral mucosal and salivary microbial community of behcet’s syndrome and recurrent aphthous stomatitis. *J. Oral Microbiol.* 2015; 7: 27150.

- [71] Nagy KN, Sonkodi I, Szoke I et al. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol.* 1998; 34: 304–8.
- [72] Pushalkar S, Ji X, Li Y et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 144.
- [73] Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PloS One.* 2014; 9: e98741.
- [74] Lee WH, Chen HM, Yang SF et al. Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer. *Sci. Rep.* 2017; 7: 16540.
- [75] Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V et al. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol. Immunol.* 2007; 22: 175–81.
- [76] Casarin RCV, Barbagallo A, Meulman T et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J. Periodontal. Res.* 2013; 48: 30–6.
- [77] Koren O, Spor A, Felin J et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108 Suppl.1: 4592–8.
- [78] Figuero E, Sanchez-Beltran M, Cuesta-Frechoso S et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J. Periodontol.* 2011; 82: 1469–77.
- [79] Ohki T, Itabashi Y, Kohno T et al. Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am. Heart J.* 2012; 163: 164–7.
- [80] Jia G, Zhi A, Lai PFH et al. The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. *Br Dent J.* 2018; 224: 447-55.
- [81] Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M et al. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53: 563–71.

- [82] Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF et al. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J. Clin. Periodontol.* 2001; 28: 296–305.
- [83] Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000.* 2006; 42: 219–58.
- [84] L, Hatakka K, Savilahti E et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* 2001; 35: 412–20.
- [85] Lexner MO, Blomqvist S, Dahlen G, Twetman S. Microbiological profiles in saliva and supragingival plaque from caries-active adolescents before and after a short-term daily intake of milk supplemented with probiotic bacteria—a pilot study. *Oral Health Prev. Dent.* 2010; 8: 383–8.
- [86] Nozari A, Motamedifar M, Seifi N et al. The effect of Iranian customary used probiotic yogurt on the children's salivary cariogenic microflora. *J. Dent.* 2015; 16: 81–6.
- [87] Cildir SK, Sandalli N, Nazli S et al. A novel delivery system of probiotic drop and its effect on dental caries risk factors in cleft lip/palate children. *Cleft Palate Craniofac. J.* 2012; 49: 369–72.
- [88] Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *J. Dent.* 2016; 48: 16–25.
- [89] Krasse P, Carlsson B, Dahl C et al. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed. Dent. J.* 2006; 30: 55–60.
- [90] Iniesta M, Herrera D, Montero E et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 2012; 39: 736–44.
- [91] Koll-Klais P, Mandar R, Leibur E et al. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005; 20: 354–61.

[92] Pan X, Yang Y, Zhang JR. Molecular basis of host specificity in human pathogenic bacteria. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3: e23.

[93] Baron C. A novel strategy to target bacterial virulence. *Future Microbiol.* 2013; 8: 1–3.

## RINGRAZIAMENTI

Giunta ormai al termine di questo percorso, desidero ringraziare chi, in un modo o nell'altro, mi ha permesso di raggiungere questo traguardo.

Innanzitutto desidero ringraziare la mia relatrice, la prof.ssa Orsini, le correlatrici, dott.sse Fabia Profili e Giulia Orilisi e il dott. Marco Mascitti per la disponibilità e il prezioso aiuto offertomi per la stesura di questo lavoro, ma anche per avermi fatto conoscere meglio l'interessante mondo dell'odontoiatria.

Un ringraziamento, poi, va sicuramente ai miei genitori e a mia sorella, che ancora una volta mi hanno supportata dall'inizio alla fine di questo percorso, e che, anche a causa delle restrizioni legate alla pandemia e al maggior tempo passato a casa, in alcuni casi forse hanno dovuto anche sopportarmi. Ringrazio anche il resto della mia famiglia, che mi è stata vicina anche con un semplice pensiero, chi sta lottando e chi invece purtroppo non c'è più.

Un ringraziamento speciale senza dubbio va ad Alessio, che mi è stato sempre accanto anche quando eravamo distanti e mi ha sostenuto e aiutato incondizionatamente sia nei momenti di gioia che in quelli più difficili di questo percorso, senza mai smettere di credere in me.

Infine ringrazio le mie colleghe e compagne di corso con le quali ho condiviso questi due anni, perché la preziosa collaborazione, il lavoro di squadra, l'aiuto e il sostegno reciproco, anche quando siamo state costrette a farlo da lontano, sono stati essenziali nell'arrivare fino alla fine.

Silvia