



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE  
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in Igiene Dentale  
Presidente: Prof. Andrea Santarelli

**Analisi ATR-FTIR del potenziale di  
remineralizzazione di tre diversi dentifrici  
su *white spot lesions***

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

Candidato:  
**Bianca Falconi**

*Anno Accademico 2021-2022*



# INDICE

<b>SOMMARIO</b> .....	1
<b>INTRODUZIONE</b> .....	2
<b>1 SMALTO DENTALE</b> .....	3
<b>2 WHITE SPOT LESIONS</b> .....	5
<b>2.1 Classificazione ICDAS</b> .....	7
<b>2.2 Fattori che causano la formazione delle WSLs</b> .....	9
2.2.1 <i>Difetto di maturazione dello smalto</i> .....	9
2.2.2 <i>Fluorosi</i> .....	12
2.2.3 <i>Trauma</i> .....	14
2.2.4 <i>Trattamento Ortodontico</i> .....	15
<b>2.3 Diagnosi</b> .....	18
2.3.1 <i>Esame clinico</i> .....	18
2.3.2 <i>Esame radiografico</i> .....	19
2.3.3 <i>Transilluminazione</i> .....	21
<b>2.4 Prevenzione</b> .....	22
<b>2.5 Trattamento</b> .....	23
2.5.1 <i>Dentifrici fluorati</i> .....	23
2.5.2 <i>Collutori fluorurati</i> .....	24
2.5.3 <i>CPP-ACP</i> .....	24
2.5.4 <i>Laser</i> .....	24
2.5.5 <i>Microabrasione</i> .....	25
2.5.6 <i>Sbiancamento</i> .....	25
2.5.7 <i>Infiltrazione in resina</i> .....	26
<b>3 ANALISI STRUMENTALI PER LA VALUTAZIONE DELLE WSLs</b> .....	28
<b>3.1 Spettrometria IR a Trasformata di Fourier (FTIR)</b> .....	28
<b>4 PARTE SPERIMENTALE</b> .....	32
<b>4.1 Obiettivo dello studio</b> .....	32
<b>4.2 Materiali e Metodi</b> .....	32
4.2.1 <i>Preparazione del campione</i> .....	32
4.2.2 <i>Trattamento dei campioni</i> .....	33
4.2.3 <i>Analisi ATR-FTIR di campioni di denti</i> .....	34

<b>4.3</b>	<b>Risultati</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Discussione</b> .....	<b>38</b>
<b>4.5</b>	<b>Conclusioni</b> .....	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>41</b>

# SOMMARIO

Questa Tesi mira a determinare le caratteristiche chimiche e microstrutturali dello smalto dentale in aree superficiali con *white spot lesions* (WSLs) prima e dopo trattamento remineralizzante. In questo studio sperimentale è stata utilizzata come metodica di analisi la Microspettroscopia ATR-FTIR, al fine di valutare l'efficacia remineralizzante di tre diversi dentifrici presenti in commercio.

La Tesi è stata strutturata in quattro parti. Nella prima parte vengono descritte le caratteristiche generali della struttura dello smalto dentale. La seconda parte è incentrata sulle WSLs, descrivendone la struttura macroscopica e microscopica, i fattori responsabili della loro formazione, la classificazione, le metodiche diagnostiche, la prevenzione e il loro trattamento. La terza parte, invece, descrive la moderna tecnica analitica impiegata per la valutazione delle WSLs. Nella parte finale viene descritto il protocollo sperimentale utilizzato e discussi i risultati ottenuti, in modo da trarre conclusioni riguardo il potenziale remineralizzante dei tre diversi agenti testati sulle WSLs. I risultati ottenuti dalle analisi forniranno la base per una possibile ricerca clinica futura *in vivo* sull'efficacia di questi trattamenti mininvasivi per la remineralizzazione delle WSLs.

# INTRODUZIONE

La carie dentale rappresenta un grave rischio per la salute orale nei paesi in via di sviluppo sia durante l'infanzia che in età adulta [1]. La demineralizzazione senza cavitazione dello smalto dentale è il primo segno visibile di carie dentale [2]. La porosità dello smalto, causata dalla demineralizzazione, talvolta conferisce alla lesione un aspetto lattiginoso, presentandosi come un'opacità bianco latte sulle superfici dentali, nota come *white spot lesion* (WSL)[3]. Inoltre, questo tipo di lesioni possono essere causate da diversi fattori quali: fluorosi, ipomineralizzazione degli incisivi (MIH), assunzione di medicinali durante le fasi di mineralizzazione dello smalto, traumi, rimozione di brackets ortodontici [4]. Questo difetto dello smalto, oltre a rappresentare un problema estetico, può essere anche causa di ipersensibilità dentale.

Pertanto, la prevenzione delle WSLs inizia implementando un buon regime di igiene orale insieme all'uso di un dentifricio fluorato [5,6].

Il fluoro agisce riducendo la demineralizzazione iniziale dello smalto in presenza di acidi prodotti dai batteri cariogeni nella placca dentale, e provocando l'aumento della remineralizzazione della carie precoce dello smalto [7].

La concentrazione di fluoro dei dentifrici (sotto forma di fluoruro di sodio, monofluorofosfato, fluoruro stannoso) dovrebbe essere superiore a 1000ppm [8,9,10]; tuttavia, l'uso di un dentifricio con un'elevata concentrazione di fluoro (5000 ppm), applicato per due volte al giorno da parte di pazienti ad alto rischio di WSL, è più efficace delle formulazioni convenzionali [11,12].

Ulteriori fonti di fluoro come collutori, gel o vernici possono essere utili per quei pazienti ad alto rischio di carie e dovrebbe essere considerato dal medico come parte dell'igiene orale e del regime preventivo [13,14].

Pertanto, la prevenzione, la diagnosi e il trattamento delle WSLs sono azioni fondamentali per ridurre al minimo il rischio di progressione di queste lesioni iniziali dello smalto [15].

# 1 SMALTO DENTALE

Lo smalto dentale è il tessuto più duro del corpo umano, composto da sostanza acellulare, avascolare e calcificata. Esso costituisce il rivestimento protettivo esterno della corona del dente che protegge un complesso interno costituito da uno strato di tessuto duro, la dentina, il quale, a sua volta, racchiude un tessuto molle altamente vascolarizzato e innervato, la polpa [16].

Lo smalto dentale è formato per il 96% da materiale inorganico, per il 3% da acqua e per l'1% da matrice organica [17, 18]. La sua natura altamente mineralizzata lo rende estremamente resistente [19]; mentre l'alto contenuto di minerali dello smalto lo rende suscettibile alla demineralizzazione da parte degli acidi prodotti dai batteri nella bocca, causando la carie dentale [20].

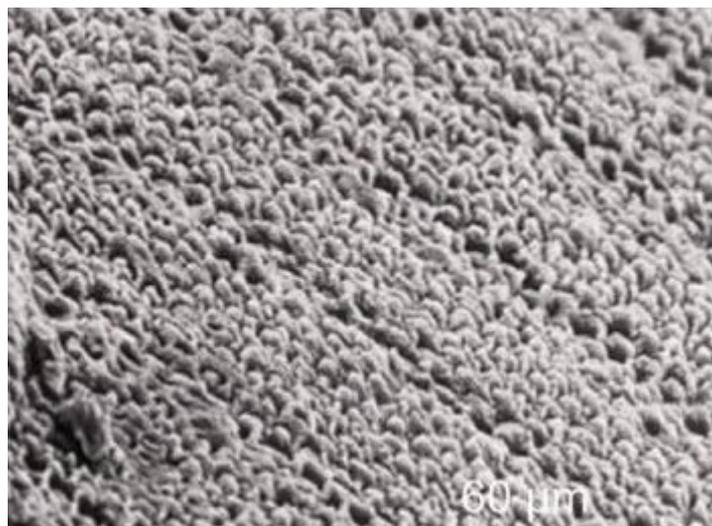
Lo smalto dentale è formato a partire da una matrice non mineralizzata prodotta da cellule polarizzate di origine epiteliale, gli ameloblasti, che producono lo smalto. In seguito al processo di mineralizzazione dei cristalli di fosfato di calcio, la matrice extracellulare deposta dalle cellule matura e il tessuto acquisisce la durezza della struttura definitiva, costituita prevalentemente da idrossiapatite.

L'idrossiapatite è assemblata in cristalli a forma di bastoncino simil prisma esagonale, in cui gli ioni che la costituiscono sono disposti in un reticolo (Figura 1).

Pertanto, la formazione dello smalto dei denti è tipicamente descritta come una sequenza di fasi consecutive che iniziano con la fase presecretoria, poi secretoria, fino allo stadio di maturazione, seguito dall'apoptosi degli ameloblasti e dall'eruzione del dente nella cavità orale [21]. Dopo che gli ameloblasti si differenziano durante la fase presecretoria, entrano nella fase secretoria con la loro morfologia caratterizzata da un processo cellulare obliquo, il processo di Tomes. La secrezione della matrice dello smalto mineralizzante inizia all'interfaccia con la dentina creando una giunzione tra due diversi materiali mineralizzati con diverse proprietà e processi di formazione, la giunzione dentina-smalto (DEJ). La deposizione della matrice dello smalto mineralizzante avviene con un ritmo circadiano lasciando una traccia di incrementi giornalieri durante la fase secretoria fino al raggiungimento dello spessore completo dello smalto e alla successiva differenziazione degli ameloblasti. Dopo una

breve fase di transizione, gli ameloblasti cambiano la loro morfologia entrando in una transizione ciclica tra liscia e arricciata, provocando come conseguenza la scomparsa del processo di Tomes. Queste morfologie alternate sono un segno distintivo della fase di maturazione e delle fluttuazioni parallele sia nel pH della matrice dello smalto che nel trasporto ionico che accompagnano la crescita dei cristalli. I cambiamenti nella morfologia cellulare riflettono anche il cambiamento nell'attività dalla secrezione all'assorbimento delle proteine della matrice dello smalto, il quale viene scisso per consentire l'espansione dei cristalli minerali. Infine, i cristalli di smalto maturano e crescono fino a incastrarsi all'interno di fasci nello smalto completato [22,23].

Placca batterica, alimenti, sostanze acide, l'atto della masticazione e anche manovre scorrette di igiene dentale comportano, a lungo andare, una perdita di sostanza mineralizzata dalla superficie dentale a cui può conseguire un indebolimento delle strutture dentarie. Carie, erosione ed abrasione sono le tre minacce principali dei tessuti duri del dente. Qualunque sia la causa del danno, però, i tessuti duri hanno un limitato grado di autoriparazione e si rendono necessari interventi esterni per riparare, dove possibile, le strutture e produrre la formazione di nuovi cristalli di idrossiapatite, in modo da rafforzare le strutture deteriorate [24].



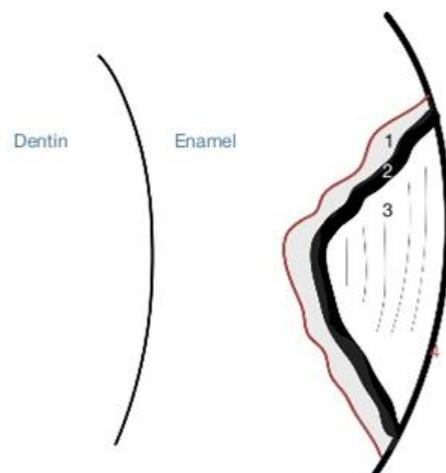
*Figura 1: Struttura prismatica dello smalto.*

## 2 WHITE SPOT LESIONS

Le lesioni a macchia bianca (WSL) sono porosità dello smalto sottosuperficiale [25] che si sviluppano nella prima fase della progressione della carie [6]. Queste lesioni senza cavitazione sono caratterizzate da un aspetto bianco, gessoso e opaco e si trovano comunemente in solchi, fessure e superfici lisce dei denti; la localizzazione più frequentemente rilevata è sul terzo cervicale [26]. L'aspetto biancastro è dovuto ad un fenomeno ottico causato dalla perdita di minerali nello smalto più superficiale. La dissoluzione dei cristalli di smalto inizia con la creazione degli spazi tra le linee di deposizione dello smalto dentale. La conseguente alterazione dell'indice di rifrazione nell'area interessata è quindi una conseguenza sia della rugosità superficiale che della perdita di lucentezza superficiale e delle alterazioni della riflessione interna, causando una maggiore opacità visiva dello smalto, dal momento che lo smalto poroso disperde più luce dello smalto sano [4].

Esaminando una WSL si distinguono quattro zone corrispettivamente dallo strato esterno verso lo strato interno dello smalto: strato superficiale relativamente intatto; corpo della lesione (questa zona presenta una notevole perdita di minerali e mostra cambiamenti nella morfologia dei cristalliti); zona scura (mostra un allargamento dei pori e una perdita di minerali del 6%) e zona traslucida che rappresenta il fronte avanzato della lesione (è caratterizzata da perdita di proteine seguita dalla rimozione di sostanze inorganiche), come illustrato nella Figura 2.

Lo strato superficiale sembra rimanere intatto a causa della presenza e del deposito di ioni calcio e fosfato dalla saliva [5].



**Figura 2:** Rappresentazione schematica dello smalto dentale a livello della white spot: (1) zona traslucida; (2) zona scura; (3) corpo della lesione; (4) strato superficiale.

La traslucenza dello smalto è un fenomeno ottico che dipende dalle dimensioni degli spazi intercristallini. Durante le prime fasi della formazione della carie, quest'ultima richiede l'essiccazione all'aria per essere visibile, poiché inizia il processo di dissoluzione dei cristalli sulla superficie esterna dello smalto, lasciando la morfologia dello smalto conservata. L'ulteriore allargamento degli spazi intercristallini si traduce in una macchia bianca, parzialmente porosa e opaca, visibile senza l'utilizzo di aria.

L'effetto di disidratazione sulla traslucenza dello smalto è il risultato della sostituzione del contenuto d'acqua attorno ai prismi dello smalto con l'aria.

In un sistema eterogeneo, come nel caso dei prismi di smalto circondati da un mezzo fluido, lo scattering (fenomeno di interazione tra smalto, aria e acqua) si verifica a causa della differenza negli indici di rifrazione (RI) dei due componenti coinvolti.

L'RI dello smalto è di circa 1,65, mentre quello dell'acqua è 1,33 e quello dell'aria è 1,00, quindi, una maggiore differenza nei valori di RI, produce una maggiore dispersione a livello dello smalto/interfaccia aerea [27].

Alcune lesioni a macchia bianca sono reversibili; possono quindi remineralizzarsi e tornare alla normalità. Tuttavia, le lesioni a macchia bianca possono anche persistere, risultando esteticamente inaccettabili e rendendo quindi necessario l'intervento di tecniche per migliorarne l'aspetto [28].

## 2.1 Classificazione ICDAS

L'*International Caries Detection and Assessment System* (ICDAS) è un metodo visivo atto a valutare i cambiamenti superficiali e la potenziale profondità istologica delle lesioni cariose, basandosi sulle caratteristiche visive della superficie [29] e consentendo di registrare la gravità e l'incidenza della carie nel suo continuum. È una procedura diagnostica che ha lo scopo di fare una diagnosi di carie e conferire un livello di gravità alla lesione cariosa intercettata.

L'ICDAS I è stato sviluppato nel 2002 ed è stato successivamente modificato in ICDAS II nel 2005. I criteri ICDAS I e II incorporano concetti tratti dalla ricerca condotta da Ekstrand et al (1995, 1997) e altri sistemi di rilevamento della carie descritti nella revisione condotta da Ismail et al (2004) [30]. Il requisito principale per l'applicazione del sistema ICDAS è l'esame di denti puliti e asciutti; l'essiccazione della superficie del dente è la chiave per rilevare le lesioni non cavitate perché l'acqua di solito ostruisce i pori dei denti cariati e l'indice di rifrazione simile del dente e dell'acqua oscura la rilevazione delle prime lesioni a macchia bianca. I denti devono essere puliti con uno spazzolino da denti o una coppetta per profilassi prima dell'esame clinico [9].

I codici di rilevamento ICDAS per la carie coronale vanno da 0 a 6 a seconda della gravità della lesione, ma esistono piccole variazioni tra i segni visivi associati a ciascun codice a seconda di una serie di fattori, tra cui le caratteristiche della superficie (solchi e fessure rispetto a superfici lisce libere), la presenza di denti adiacenti (superfici mesiali e distali) e se la carie è associata o meno a un restauro o sigillante (Figura 3):

- **Codice 0:** La superficie del dente è sana; non dovrebbero esserci prove di carie, nè cambiamento nella traslucenza dello smalto dopo un'asciugatura prolungata all'aria (tempo di asciugatura suggerito 5 secondi). Le superfici con difetti dello sviluppo, come ipoplasie dello smalto, fluorosi, usura dei denti (attrito, abrasione ed erosione) e macchie estrinseche o intrinseche, verranno registrate come suoni.
- **Codice 1:** Nel caso di dente bagnato, non vi è evidenza di alcun cambiamento di colore attribuibile all'attività cariosa, ma dopo una

prolungata essiccazione all'aria, è visibile un'opacità cariata o uno scolorimento (lesione bianca o marrone) dovuto alla carie, non coerente con l'aspetto clinico dello smalto sano.

- **Codice 2:** Il dente deve essere visto bagnato poiché si ha un'opacità cariata (lesione a macchia bianca) e/o una colorazione cariata bruna più ampia che non è coerente con l'aspetto clinico dello smalto sano, la lesione deve inoltre essere ancora visibile una volta asciutta la superficie.
- **Codice 3:** il dente visto bagnato può presentare una chiara opacità cariata (lesione a macchia bianca) e/o una colorazione cariata marrone che non è coerente con l'aspetto clinico dello smalto sano. Una volta asciugato, si verifica una perdita della struttura del dente. Questo sarà visto visivamente come prova di demineralizzazione [pareti opache (bianche), marroni o marrone scuro].
- **Codice 4:** è presente un'ombra intrinseca che può apparire di colore grigio, blu o marrone, la quale deve rappresentare chiaramente la carie iniziale sulla superficie del dente oggetto di valutazione.
- **Codice 5:** La cavitazione nello smalto opaco o scolorito espone la dentina sottostante. Il dente visto bagnato può avere l'oscuramento della dentina visibile attraverso lo smalto. Una volta asciugato, vi è evidenza visiva della perdita della struttura del dente con dentina esposta.
- **Codice 6:** Alla vista bagnata non vi è evidenza di alcun cambiamento di colore attribuibile all'attività cariosa, ma dopo una prolungata essiccazione all'aria è visibile un'opacità cariata (lesione bianca o bruna) non coerente con l'aspetto clinico dello smalto sano. È presente una cavità profonda e ampia che coinvolge almeno la metà della superficie del dente o forse raggiunge la polpa, con dentina esposta [31].



*Figura 3: Classificazione ICDAS con score da 0 a 6: rappresentazione clinica.*

## **2.2 Fattori che causano la formazione delle WSLs**

### *2.2.1 Difetto di maturazione dello smalto*

*Molar incisor hypomineralization* (MIH) è definito come un difetto di maturazione dello smalto nei bambini e negli adolescenti che coinvolge da uno a quattro primi molari permanenti e occasionalmente coinvolge incisivi permanenti [32,33]. (Figura 4) L'aumento del numero di carie è dovuto allo smalto ipomineralizzato, che ha meno bordi e cristalli distinti del prisma, uno spazio interprismatico più pronunciato e il dente permanente immaturo ha un rapporto più elevato di apatite carbonatica rispetto all'idrossiapatite [34]. Di conseguenza, lo smalto MIH è più poroso e più debole dello smalto normale e si presenta come un'opacità di colore diverso nei denti colpiti, che a volte subiscono una rottura post-eruttiva [35,36].

Molecolarmente, lo smalto interessato da MIH presenta un'elevata quantità di proteine, come l'albumina sierica e il collagene di tipo I, dunque si suggerisce che la presenza di queste, inibisca la crescita dei cristalli di idrossiapatite e della maturazione dello smalto, portando ad una riduzione del contenuto minerale di esso [37,38,39,40].

Le linee guida dell'Accademia Europea di Odontoiatria Pediatrica sono spesso utilizzate per diagnosticare l'MIH e includono i seguenti criteri: opacità chiaramente demarcata a livello occlusale e buccale, superfici delle corone, discromie bianche o giallo-marroni, difetti MIH di almeno 1 mm di diametro, presenza di ipersensibilità, presenza di restauri atipici e necessità di estrazione di denti permanenti [41,42].

La gestione clinica dell'MIH è difficile a causa del rapido sviluppo della carie dentale, della cooperazione limitata dei bambini e della rottura ripetuta dei restauri [43].

MIH è stato inizialmente descritto come un difetto idiopatico [44]; la maggior parte degli studi suggerisce che una combinazione di fattori può influenzare gli ameloblasti, con conseguente formazione anormale dello smalto che porta a MIH [45].

Gli ameloblasti possono essere influenzati negativamente sia nel periodo prenatale che postnatale dello sviluppo dei denti da altri antecedenti:

- basso peso alla nascita;
- malattia materna o stress psicologico durante la gravidanza;
- complicazioni del parto;
- diossine nel latte materno durante l'allattamento;
- nutrizione;
- fumo;
- asma;
- polmonite;
- infezioni respiratorie;
- otite media;
- tonsillite;
- varicella;
- uso precoce di amoxicillina in quelli con MIH [46,47].

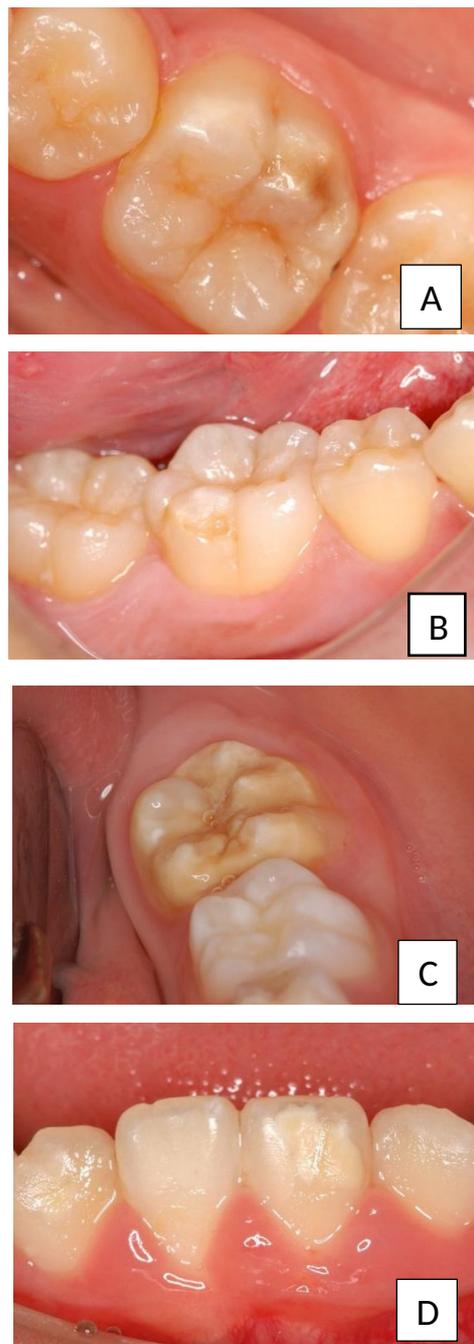
Crombi et al. ha affermato inoltre che ci sono prove che sostengono il legame tra MIH ed esposizione al bifenil/diossina policlorurato.

Sebbene l'eziologia della MIH sia ancora sconosciuta, sembra che una combinazione di fattori ambientali, genetici ed epigenetici contribuisca a questo disturbo [48,49]. In diversi studi è stato dimostrato che la prevalenza di MIH varia dal 2,8% al 44%. Tra gli studi con più di 1000 soggetti, la prevalenza di MIH varia dal 2,8% al 21%. Nel complesso, la prevalenza di MIH varia in base al paese, alla regione e al gruppo di età studiato [50].

I problemi clinici più comunemente riportati per i pazienti con MIH includono rottura dello smalto post-eruttiva che porta all'esposizione della dentina; ipersensibilità; mancanza di effetto dell'anestesia locale; problemi estetici nei denti anteriori; rapida progressione alla carie e problemi comportamentali durante il trattamento dovuti a paura e ansia [51,42].

Si rende pertanto necessaria una cura ottimale per ridurre al minimo la rottura posteruttiva dello smalto e qualsiasi danno dovuto alla carie e per migliorare la salute dei denti affetti da MIH. Nei casi lievi, viene intrapresa una terapia preventiva di

remineralizzazione per prevenire ulteriori crolli e carie secondarie. L'approccio fondamentale per i denti affetti da MIH è l'utilizzo quotidiano con dentifricio contenente almeno 1000 ppm di fluoro. L'applicazione professionale del fluoruro topico può migliorare la remineralizzazione dello smalto e la resistenza alla demineralizzazione fornendo un serbatoio di ioni fluoruro per la rideposizione di fluorapatite durante la remineralizzazione [52].



**Figura 4:** Presentazioni di MIH.

*A: Opacità scura del dente in un primo molare permanente inferiore. B: Difetto di smalto in un primo molare permanente inferiore infetto. C: Difetto di smalto e dentina in un primo molare permanente inferiore. D: Opacità bianca del dente nell'incisivo inferiore.*

## **2.2.2 Fluorosi**

La fluorosi dentale è una malattia endemica caratterizzata da un'eccessiva deposizione di fluoruri nei tessuti duri e molli, solitamente osservata tra i pazienti pediatrici. Colpisce principalmente le famiglie che risiedono in aree ad alto contenuto di fluoro con una quantità eccessiva di esso presente nell'acqua potabile, come India, Sri Lanka, Cina, Africa orientale, Medio Oriente e Sud America [53,54,55]. Perciò le fonti più comuni di fluoruro ingerito sono l'acqua potabile fluorata, il dentifricio, gli integratori e le formule per bambini [56]; infatti i bambini di età compresa tra 1 e 4 anni sono ad alto rischio, mentre il rischio diminuisce successivamente intorno agli 8 anni di età. [57,58]. Durante lo sviluppo del dente, un'elevata concentrazione di fluoro influenzerà la cellula che forma lo smalto, l'ameloblasto, specialmente durante la formazione di esso [59].

A causa dell'aumento del fluoruro durante la mineralizzazione dello smalto, vi è una diminuzione della concentrazione di ioni calcio liberi nella matrice mineralizzante, la quale provoca un'inibizione dell'enzima proteasi dalla degradazione delle proteine della matrice durante la fase di maturazione. Pertanto, la degradazione delle proteine della matrice è ritardata. Inoltre, la presenza della ritenzione indotta dal fluoro delle proteine della matrice dello smalto, porta a una ridotta crescita dei cristalli come amelogenine, ameloblastine, tufteline, smaltine e proteine solfate ad alto peso molecolare [60,61,62].

La fluorosi dentale è caratterizzata dalla presenza di smalto con colorazione brunastra dei denti, smalto butterato e striature bianche bilaterali, diffuse, sottili, orizzontali con placca macchiata [53] (Figura 5). L'assunzione giornaliera raccomandata di fluoro per la prevenzione primaria della fluorosi è compresa tra 0,05 e 0,07 mg F/Kg/giorno [63]. Tuttavia, la fluorosi compare se la concentrazione di fluoro è superiore a 1,5-4 mg/L [64]. Genitori e pediatra dovrebbero svolgere un ruolo importante per ottenere la massima protezione contro la carie dentale e ridurre al minimo il rischio di fluorosi dentale tra i bambini.

Clinicamente, la fluorosi dentale è grave nei premolari e nei secondi molari permanenti e meno negli incisivi mandibolari permanenti e nei primi molari permanenti. Inoltre, la gravità della fluorosi dentale dipende dallo spessore dello smalto. Pertanto, più spesso è

lo smalto, più grave è la fluorosi dentale, caratterizzata dall'aspetto bianco della porzione superficiale delle cuspidi e dei bordi incisali, definito *snow-capped* per la sua morfologia [65].

Dean's Index è stato introdotto da Dean nell'anno 1934, che è la classificazione della fluorosi basata sulla sua interpretazione dell'aspetto, tutt'ora ampiamente utilizzata [66]; infatti può essere lieve o grave in base a diversi fattori come la durata e quantità di esposizione al fluoro, risposte individuali, peso, età, grado di attività fisica, fattori nutrizionali e crescita ossea [67]. Una forma lieve di fluorosi può apparire attraverso minuscole striature bilaterali, che sono impercettibili, diffuse, opache e bianche che scorrono orizzontalmente sullo smalto, mentre nella forma da moderata a grave, appare uno scolorimento brunastro dello smalto insieme a usura sulla superficie a causa della scarsa mineralizzazione [68]. Pertanto, sono stati raccomandati vari approcci terapeutici per i pazienti con fluorosi dentale a seconda della gravità della malattia: micro/macro abrasione, sbiancamento, restauri in composito, faccette e corone complete e infiltrazione in resina [69].



**Figura 5:** Ripercussioni dentali dell'intossicazione sistemica da fluoro.

### 2.2.3 Trauma

Le WSLs di origine traumatica possono presentare una varietà di espressioni cliniche, che differiscono nella forma, localizzazione e anche colore. Gli studi hanno dimostrato che circa il 30% di tutti i bambini di età inferiore ai 7 anni subisce lesioni a uno dei loro incisivi decidui e che le lesioni più gravi ai denti decidui si verificano in età compresa tra 1 e 3 anni [70].

Gli effetti del trauma sui denti decidui variano e comprendono alterazioni tissutali patologiche come necrosi pulpare, riassorbimento radicolare interno e/o esterno e obliterazione del canale pulpare. Sono generalmente lesioni puntiformi situate nel terzo incisale della corona dentale (Figura 6). Nella maggior parte dei casi, riguardano un unico dente: colpiscono più comunemente gli incisivi mascellari [71]. Questa alterazione dello smalto si verifica perché l'apice della radice del dente deciduo, per intrusione, interferisce con gli ameloblasti durante la formazione della corona del dente permanente; a tale proposito risulta fondamentale il momento in cui avviene il trauma correlato allo stadio di formazione dell'elemento dentale in quanto deve avvenire in concomitanza con la formazione dello smalto coronale.

A livello degli incisivi, i due tipi di dentatura sono separati solo da una sottile barriera ossea di spessore inferiore a 3 mm, o talvolta anche da semplice tessuto connettivo fibroso. Una leggera infiammazione periapicale può quindi disturbare la mineralizzazione del germe sottostante, a seconda del suo grado di formazione (ipoplasia di Turner). La discromia traumatica può interessare dalla superficie a tutto lo spessore dello smalto. Se il danno è causato nella fase iniziale della formazione dello smalto, la WSL è di notevole profondità. Se, invece, avviene nella fase finale viene alterato solo lo strato superficiale di smalto [72]. Una riparazione ad integrum di questa lesione non è apparentemente possibile e persiste una cavità esterna nella superficie dello smalto. Differentemente dalle altre forme discromiche, la forma traumatica tende ad approfondirsi in profondità. A seguito di infiltrazione resinosa, la resina riesce a penetrare gli strati più esterni ma non quelli interni. Quindi sarà visibile un alone bianco in profondità [73].



*Figura 6: White spot lesion di origine traumatica.*

#### *2.2.4 Trattamento Ortodontico*

Durante il trattamento ortodontico, i pazienti sono spesso esposti al rischio di demineralizzazione dello smalto adiacente agli apparecchi ortodontici a causa della scarsa igiene orale. I batteri acidogeni, come lo *Streptococcus mutans* e *Lactobacilli*, che si trovano nella placca dentale, metabolizzano i carboidrati assunti con la dieta e i loro sottoprodotti degli acidi organici, causando la demineralizzazione dello smalto, che si manifesta come WSL, ovvero lesione da carie senza cavitazione, che se non viene trattata, può evolvere in carie cavitata.

Clinicamente, la formazione di WSL attorno agli apparecchi ortodontici può verificarsi entro 4 settimane dal trattamento ortodontico [74].

Gli apparecchi ortodontici fissi rappresentano un importante fattore di rischio per l'insorgenza della carie per diversi motivi (Figura 7) [75]:

- con la struttura irregolare dei brackets, creano un maggior numero di punti di ritenzione della placca sulle superfici lisce del dente che normalmente sono meno interessate dalla carie;
- ostacolano l'azione ritentiva della saliva sulle guance, labbra e lingua;
- rendono maggiormente complesse le normali manovre di igiene orale.

La demineralizzazione e la remineralizzazione avvengono costantemente sulla superficie del dente. In condizioni ideali questi due processi sono perfettamente

bilanciati tra loro e la saliva riesce svolgere la sua azione remineralizzante [76]. Invece, in ambiente acido, l'idrossiapatite che forma lo smalto inizia a dissolversi, questo processo di demineralizzazione si interrompe e riprende quando il pH supera 5,5. Nei pazienti sottoposti a trattamento ortodontico fisso, lo spostamento verso un ambiente più ricco di batteri cariogeni e acidogeni, favorisce lo squilibrio di questo processo [77]. Ciò avviene grazie agli ioni calcio, fosfato e fluoruro disciolti nella saliva e presenti in concentrazioni diverse a seconda delle variazioni del PH salivare ed è più rapido nei primi mesi dopo la rimozione dell'apparecchio fisso. Quando gli ioni fluoro sono presenti nel biofilm salivare e il PH è compreso tra 4,5 e 5,5, i cristalli di idrossiapatite disciolti vengono sostituiti da cristalli di fluorapatite più resistenti durante la fase di remineralizzazione [78] (Figura 8).

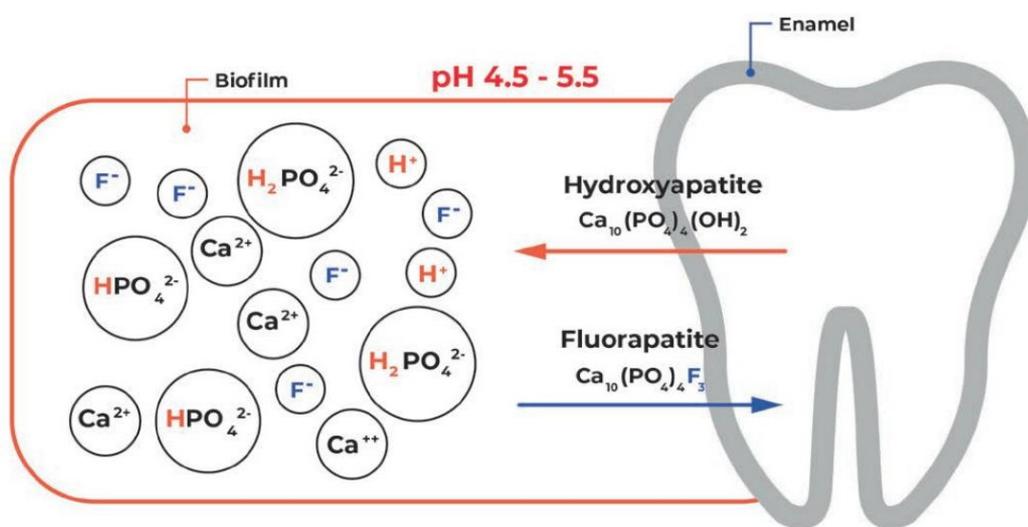


**Figura 7:** Fotografie cliniche rappresentative: (A) prima del trattamento ortodontico (B) durante il trattamento ortodontico e (C) post-ortodonzia, è stato eseguito un trattamento remineralizzante per la presenza di una grave demineralizzazione dello smalto.

È stato riportato che la prevalenza di macchie bianche nel trattamento ortodontico è del 38% dopo 6 mesi e del 46% dopo 12 mesi, rispetto all'11% nel gruppo di controllo [79].

L'area maggiormente colpita da WSLs è la superficie del margine gengivale vestibolare dei denti anteriori mascellari, mentre quelli posteriori sono meno colpiti: nell'arcata superiore l'incidenza è maggiore per l'incisivo laterale (34%), simile per i canini (31%) e premolari (28%) e inferiori per gli incisivi centrali (17%) [80].

Queste lesioni possono essere ridotte migliorando l'igiene orale, riducendo l'assunzione di carboidrati nella dieta e applicando fluoruro topico. La sicurezza dell'uso del fluoro è stata ampiamente dimostrata e sono stati proposti vari mezzi di applicazione topica, inclusi gel, collutori e vernici, tuttavia molte strategie richiedono un'elevata compliance del paziente per essere efficaci [81].



**Figura 8:** Scambio ionico nella fase di remineralizzazione: quando nel biofilm salivare sono presenti ioni fluoro ( $\text{F}^-$ ) e il pH è compreso tra 4,5 e 5,5, i cristalli di idrossiapatite disciolti vengono sostituiti da cristalli di fluorapatite più resistenti.

## 2.3 Diagnosi

Nella prevenzione della carie un ruolo fondamentale lo ha la diagnosi, attraverso la quale vengono valutate le condizioni dei tessuti dentali, la presenza o meno di lesioni cariose e l'attività delle stesse [82].

### 2.3.1 Esame clinico

L'esame clinico consiste nell'anamnesi, in un esame visivo e tattile. Oltre ad esaminare lo smalto e le superfici radicolari dei denti, occorre ispezionare i margini dei restauri e dei sigillanti, i brackets ortodontici e ad altri dispositivi applicati sui denti che ostacolano la rimozione della placca e rendono più probabile lo sviluppo di lesioni cariose dello smalto.

Generalmente un esame clinico prevede:

- Esame dei tessuti molli del cavo orale, per intercettare eventuali patologie del rivestimento mucoso della bocca: palato, guance, pavimento orale e lingua;
- Valutazione del livello di igiene orale;
- *Full-Mouth Plaque Score* (FMPS) per valutare la quantità e la localizzazione di placca e tartaro;
- *Full-Mouth Bleeding Score* (FMBS) per valutare la quantità e la localizzazione del sanguinamento;

In entrambi vengono analizzate 4 superfici: vestibolare, linguale/palatale, mesiale e distale.

- Sondaggio parodontale con identificazione di eventuali tasche e recessioni;
- *Periodontal Screening and Recording* (PSR) per valutare lo stato di salute parodontale

L'esame viene effettuato a sestanti e a ognuno viene assegnato un codice da 0 a 4 [109]:

Il codice 0 indica salute gengivale, perché la banda scura della sonda (fra 3,5 e 5,5) resta totalmente visibile e non si rivelano placca, tartaro e margini debordanti, il codice 1 indica la presenza di gengivite per via della comparsa di sanguinamento, il codice 2 la presenza di fattori ritentivi per la placca batterica, i codici 3 e 4 rispettivamente la

presenza di tasche poco profonde (3,5-5,5 mm) e profonde (6 mm o più) con conseguente scomparsa della banda scura della sonda [5].

- *Decayed, missing and filled teeth* (DMTF) che misura la situazione passata e presente di esperienza di carie, sommando i denti cariati, mancati per problemi di carie ed otturati, sia in dentatura decidua che in dentatura permanente [6]. Per i denti anteriori si calcolano le 4 superfici: vestibolare, mesiale, distale, linguale/palatale. Per i denti posteriori si calcolano invece 5 superfici: vestibolare, mesiale, distale, linguale/palatale e occlusale [7].

### 2.3.2 *Esame radiografico*

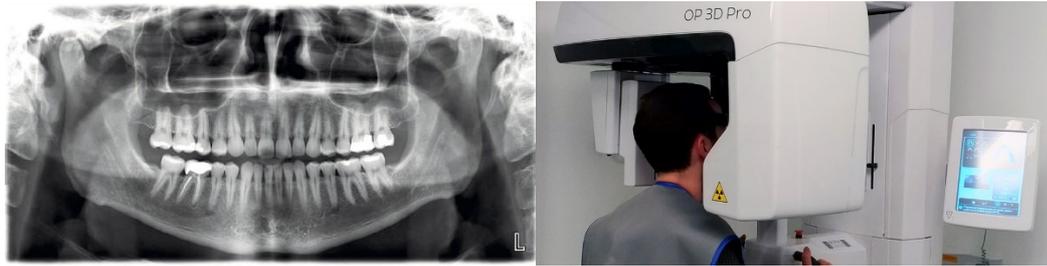
L'esame radiografico viene generalmente eseguito dopo l'esame clinico. Infatti, la componente clinica della diagnosi serve ad identificare la sede specifica in cui eseguire l'esame radiografico [86]. Esistono varie tipologie di radiografie:

- Radiografia endorale periapicale (Figura 9): interessa solo alcuni elementi dentari e ci permette di vedere i denti in maniera completa e quindi la loro corona, radice completa e tessuti circostanti. Con questo tipo di radiografia possiamo individuare ascessi, cisti, carie, malattie parodontali e denti inclusi [9].



**Figura 9:** Esempio di radiografia endorale periapicale.

- Ortopantomografia: radiografia extraorale nella quale è possibile osservare in un'unica pellicola sia i denti superiori che inferiori, parte della mandibola e del mascellare superiore, e altre strutture ossee circostanti (Figura 10).



**Figura 10:** Esempio di ortopantomografia e ortopantografo.

- Radiografia *bitewing*: l'esame *bitewing*, se correttamente eseguito, rappresenta per semplicità e fedeltà d'immagine, l'esame radiografico preferenziale per compiere diagnosi di carie nei settori latero-posteriori e in particolare a livello interdentale. L'obiettivo è quello di poter visualizzare tutte le superfici interprossimali senza sovrapposizioni [88] (Figura 11).



**Figura 11:** Radiografia di tipo *Bitewing* con centratore per una corretta esecuzione.

Le dosi di radiazioni che si ricevono durante una radiografia dentale sono normalmente molto basse, tali da non rappresentare un danno per il paziente [11].

Oggi esistono tecnologie come la radiografia digitale che assicurano elevati standard qualitativi dell'immagine con una minore dose di radiazioni rispetto agli esami tradizionali: con la radiografia digitale il paziente assorbe fino all'85% in meno di radiazioni [90].

### 2.3.3 Transilluminazione

La transilluminazione è una tecnica che prevede il passaggio della luce infrarossa attraverso i tessuti dentali. Attraverso la variazione di rifrazione della luce nelle zone affette da carie, permette una precoce individuazione. Lo smalto appare trasparente, mentre le lesioni porose intrappolano e assorbono la luce. Questo permette al clinico di valutare la struttura del dente e l'effettiva struttura di qualsiasi lesione cariosa con estrema precisione. Questa metodica richiede una luce ad alta intensità emessa da un puntale con un piccolo diametro. Alla transilluminazione, le aree interessate dal processo carioso appaiono più scure, mentre i tessuti dentali sani vengono perfettamente attraversati dalla luce apparendo chiari. Se posizionando una fonte di luce palatale la macchia tende a illuminarsi in modo deciso, è molto probabile che si trovi nel primo spessore dello smalto, mentre una scarsa illuminazione generalmente indica una maggiore profondità [13] (Figura 12).



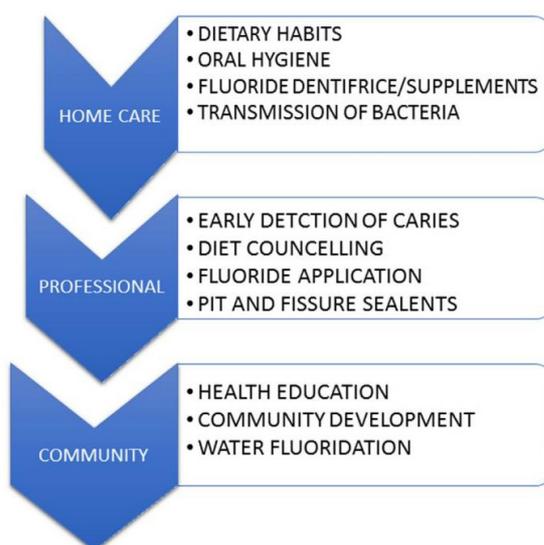
**Figura 12:** Dente osservato mediante metodica di transilluminazione.

## 2.4 Prevenzione

Nella prevenzione della carie dentale la fluoroprofilassi rappresenta un mezzo fondamentale (Figura 13). Il fluoro può essere somministrato per via sistemica, attraverso l'assunzione di acqua, latte, integratori, e risulta essere utile durante l'odontogenesi e per via topica, attraverso l'utilizzo di dentifrici, collutori o gel; questa via di somministrazione è in grado di fornire concentrazioni molto più elevate di fluoro rispetto a quelle contenute, ad esempio, nell'acqua potabile [14].

Le linee guida dell'OMS prevedono un programma di fluoroprofilassi dettagliato [15]:

- Nei bambini da 6 mesi a 6 anni a basso rischio occorre utilizzare un dentifricio con almeno 1000 ppm di fluoro, 2 volte al giorno, in dose pea-size.
- Nei bambini da 6 mesi a 6 anni a medio rischio occorre effettuare in aggiunta l'applicazione topica di fluoro ogni 6 mesi.
- Nei bambini da 6 mesi a 3 anni ad alto rischio occorre in aggiunta l'applicazione topica di fluoro ogni 3 mesi e 0,25 mg/die di fluoro con gocce, invece dai 3 anni ai 6 anni 0,50 mg/die di fluoro con gocce o pastiglie.
- Nei bambini dai 6 anni in poi a basso rischio occorre utilizzare un dentifricio con almeno 1450 ppm di fluoro, 2/3 volte al giorno.
- Nei bambini dai 6 anni in poi a medio rischio occorre in aggiunta l'applicazione topica di fluoro ogni 6 mesi, invece ogni 3 mesi in quelli ad alto rischio.



**Figura 13:** Strategie per la prevenzione della carie.

## 2.5 Trattamento

### 2.5.1 Dentifrici fluorati

I dentifrici al fluoro (sotto forma di fluoruro di sodio, monofluorofosfato, fluoruro stannoso) sono sicuramente il modo più efficace per prevenire le WSLs e sono attualmente i più comuni nelle abitudini di igiene orale quotidiana (Figura 14). Infatti, per una maggiore efficacia del dentifricio, si consiglia di non sciacquare la bocca con acqua subito dopo aver lavato i denti per permettere al fluoro di fissarsi sulle superfici dentali. L'efficacia dei dentifrici con 1000ppm di fluoro è stata da tempo dimostrata [94] ed è stato anche provato che una concentrazione di 5000ppm di fluoro è in grado di combattere la demineralizzazione dello smalto e facilitarne la remineralizzazione ancora più rapidamente [95]. D'altra parte, una remineralizzazione troppo rapida impedirebbe la penetrazione di ioni calcio e fosfato negli strati più interni dello smalto [96]. Sulla base di queste osservazioni si è concluso che l'uso di sostanze a maggior rilascio iniziale di fluoruro sono più efficaci nel ridurre la demineralizzazione dello smalto [97]; mentre, al contrario, per favorire una corretta remineralizzazione, sono più indicati prodotti a minore concentrazione di fluoro. Per bambini di età inferiore ai 9 anni a rischio di fluorosi dentale, si raccomanda che lo spazzolino venga risciacquato accuratamente dopo aver utilizzato un dentifricio ad alto contenuto di fluoro [98].



**Figura 14:** Quantità di dentifricio in dose pea-size.

### *2.5.2 Collutori fluorurati*

I collutori per uso quotidiano contengono 225ppm di fluoro e sono consigliati ai bambini di età superiore ai 6 anni che sono a rischio di carie moderato o alto. Durante il trattamento ortodontico, raccomandano come metodo migliore per prevenire la demineralizzazione dello smalto l'uso quotidiano di collutori allo 0,05% di NaF [99]. Invece, secondo Hirschfield [100], è consigliato l'uso di collutori al fluoruro di fosfato acidulato (APF) per rendere lo smalto più resistente alla decalcificazione indotta dall'ortodonzia.

L' utilizzo dei collutori fluorati è consigliato per 1 o 2 minuti senza risciacquo [101].

### *2.5.3 CPP-ACP*

Tra i possibili trattamenti delle lesioni iniziali dello smalto c'è il fosfopeptide di caseina fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP) [102], un materiale derivato dalle proteine del latte in grado di mantenere un'elevata concentrazione di ioni calcio e fosfato sulla superficie dei denti [103]. È noto che l'assunzione di sostanze cariogene provoca un abbassamento del pH salivare; in questo ambiente acido, gli ioni calcio e fosfato vengono trasportati da questa proteina (CPP) sulla superficie dentale, aiutando a prevenire la carie e favorendo la remineralizzazione dello smalto. Inoltre, questo prodotto ha dimostrato di avere un effetto tampone sulla placca e un effetto batteriostatico, in quanto può inibire l'adesione e la crescita di *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. CPP-ACP è disponibile in commercio attraverso gomme da masticare, dentifrici, compresse, spray, collutori e mousse. [104].

### *2.5.4 Laser*

L'applicazione dei laser per prevenire la carie risale al 1972. I raggi laser aumentano la microdurezza dello smalto e la resistenza all'attacco acido. I principali laser utilizzati in odontoiatria includono: laser ad argon, CO<sub>2</sub>, Nd YAG e l'erbio YAG [105].

L'irradiazione dello smalto con raggi laser ad argon riduce la quantità di demineralizzazione fino al 30%-50%. Fox ha riportato che, oltre a ridurre la demineralizzazione dello smalto, hanno abbassato il valore del pH della soglia di dissoluzione, hanno provocato cambiamenti nella morfologia della superficie, mantenendola intatta. Sono stati suggeriti diversi meccanismi per spiegare l'aumento della resistenza dello smalto alla carie dopo l'irradiazione laser; quello più probabile sembra essere attraverso la formazione di microspazi all'interno dello smalto dopo l'esposizione ai raggi laser. Questi microspazi intrappolano gli ioni rilasciati e fungono da siti per la remineralizzazione all'interno della superficie dello smalto [106].

### *2.5.5 Microabrasione*

La microabrasione migliora l'estetica dei denti eliminando lo strato esterno di smalto difettoso. Questa tecnica invasiva consiste nell'applicazione di una pasta abrasiva contenente acido cloridrico al 6,6% (Opalustre) o al 6% (Whiteness RM) e microparticelle di carburo di silicio di dimensioni comprese tra 20 e 160 µm per rimuovere le parti superficiali della lesione [78].

### *2.5.6 Sbiancamento*

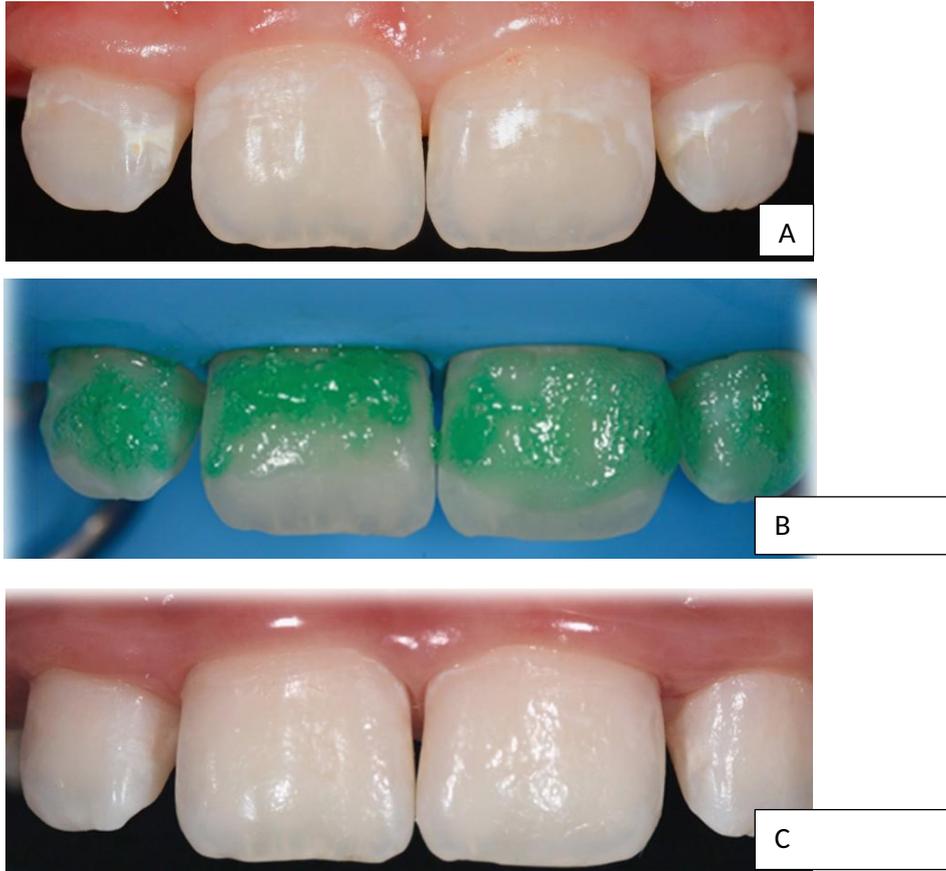
I risultati estetici dello sbiancamento sono limitati e potrebbero dar luogo a sensibilità dentale e ad una diminuzione della microdurezza dello smalto [107]. Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che lo sbiancamento della carie con il 10% di perossido di carbammide potrebbe camuffare le WSLs senza alcun effetto sulle proprietà chimiche e meccaniche dello smalto; inoltre, l'applicazione di CPP-ACP è stata considerata un trattamento aggiuntivo per promuovere il guadagno di minerali nella lesione sotto la superficie [108]. Khoroshi et al. ha mostrato in uno studio *in vitro* che una procedura di sbiancamento delicata e non invasiva incorporando tre diversi biomateriali, tra cui nano-BAG, nano-idrossiapatite e fosfato di calcio nano-amorfo, negli agenti sbiancanti, potrebbe limitare gli effetti negativi dello sbiancamento e prevenire le alterazioni della superficie dello smalto [109]. Questa modalità di trattamento dovrebbe essere riservata ai pazienti con una buona igiene orale per mascherare le lesioni [110].

### *2.5.7 Infiltrazione in resina*

L'infiltrazione in resina è un'alternativa per migliorare l'aspetto delle WSLs; questa tecnica si basa sull'utilizzo di acido cloridrico al 15% per aumentare la porosità dello strato superficiale dello smalto seguito dall'applicazione di una resina a bassa viscosità in grado di infiltrare microporosità dello smalto demineralizzato fino a 400 micron di profondità (Figura 14). Questa resina inoltre è in grado di:

- migliorare l'aspetto della lesione e rinforzare la struttura indebolita dei prismi dello smalto sin dalla prima applicazione perché ha un indice di rifrazione della luce simile a quello dello smalto sano;
- sigillare la superficie, migliorandone l'aspetto e proteggendola dalla degradazione degli acidi;
- interrompere il processo di demineralizzazione.

Attualmente, il prodotto commerciale più diffuso che utilizza questo meccanismo è un innovativo sistema di infiltrazione della carie, che rende la lesione cariosa invisibile, allineandola otticamente al resto della superficie sana dello smalto. È composto principalmente da trietilenglicole dimetacrilato fotopolimerizzabile (TEGDMA), che infila per capillarità all'interno delle WSLs a causa della sua bagnabilità e viscosità [111]. È una tecnologia microinvasiva che riempie, rinforza e stabilizza lo smalto demineralizzato, senza perforare o sacrificare la struttura sana del dente [112].

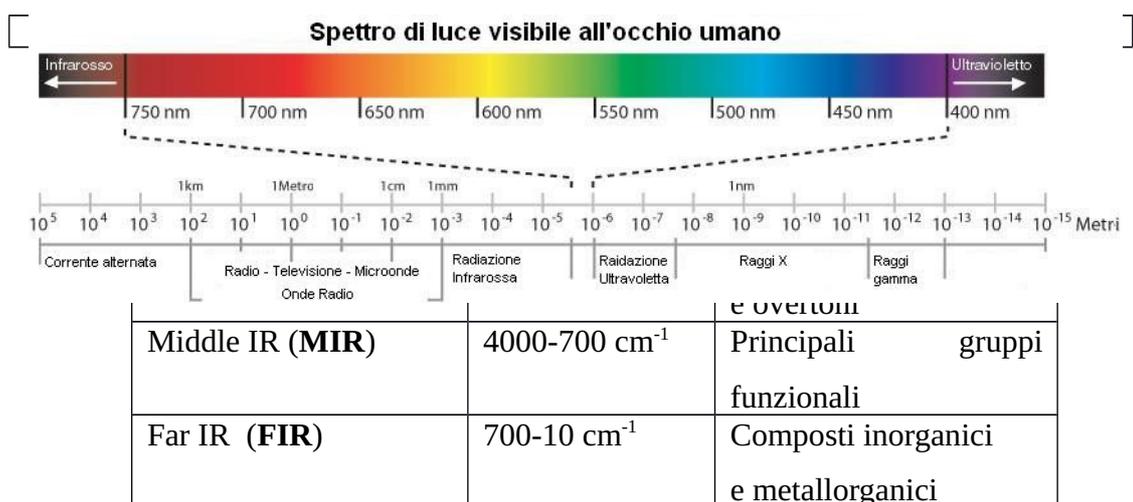


**Figura 14:** Prima del trattamento (A). Trattamento con infiltrazione in resina (B). Risultato dopo trattamento (C).

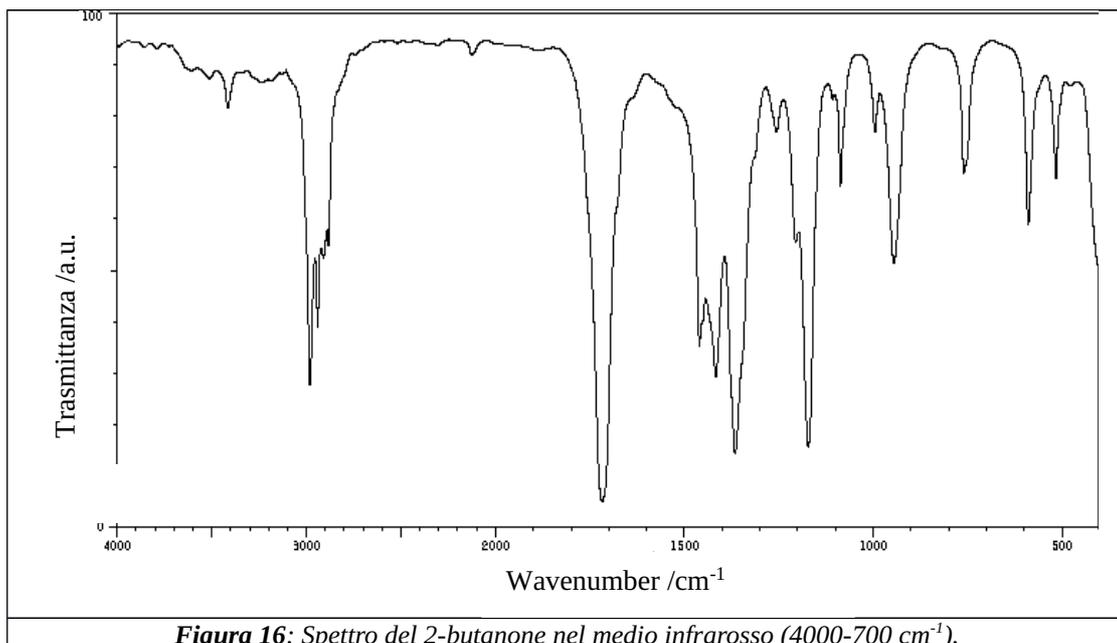
## 3 ANALISI STRUMENTALI PER LA VALUTAZIONE DELLE WSLs

### 3.1 Spettrometria IR a Trasformata di Fourier (FTIR)

La radiazione infrarossa è una porzione della radiazione elettromagnetica che provoca transizioni vibrazionali nei legami presenti nelle molecole (Figura 15). Si divide in lontano IR (far IR o FIR), medio IR (mid IR o MIR) e vicino IR (near IR o NIR) (Tabella 1). Il range spettrale più usato per valutare la composizione chimica di un materiale è la regione del MIR.

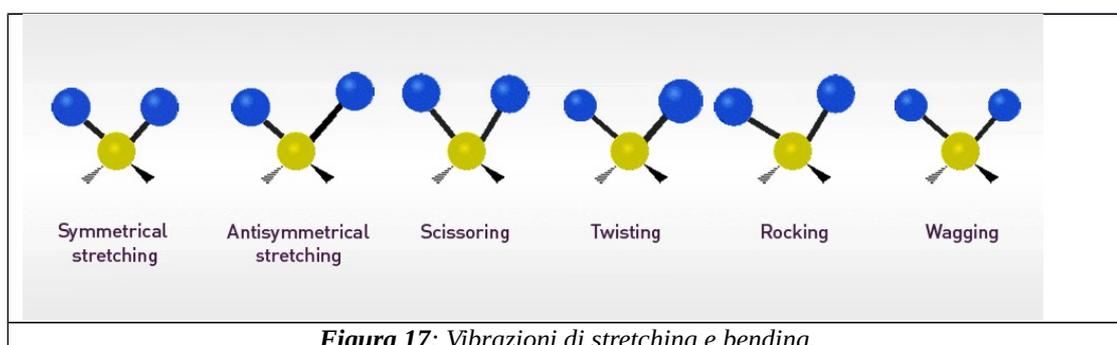


Irradiando una molecola con un opportuno intervallo di frequenze IR si generano varie transizioni vibrazionali, che possono essere riportate su uno spettro dalla cui analisi si ricavano i legami contenuti all'interno e quindi i corrispondenti gruppi funzionali (Figura 16).



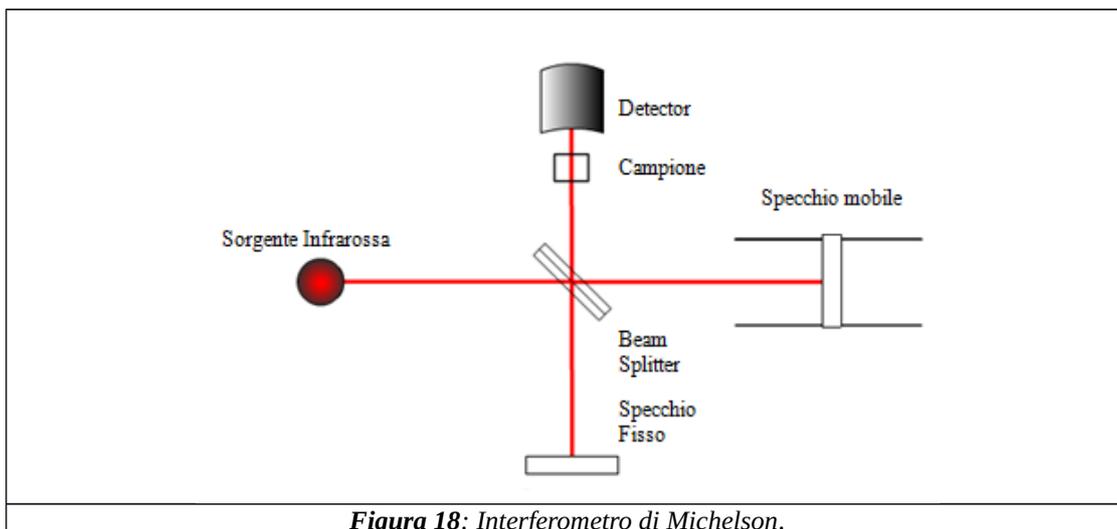
Normalmente gli spettri IR sono formati da numerose bande, di solito convolute. Per quanto riguarda il medio infrarosso, la parte destra dello spettro, denominata "zona dell'impronta digitale", è associata alle vibrazioni di tutto lo scheletro ed è quindi tipica della molecola nella sua interezza (1400-700  $\text{cm}^{-1}$ ); nella parte sinistra si trovano invece le bande corrispondenti alle vibrazioni dei singoli gruppi funzionali, che hanno assorbimenti abbastanza fissi a prescindere dal resto della molecola ("zona dei gruppi funzionali", 4000-1400  $\text{cm}^{-1}$ ).

Le transizioni vibrazionali possono essere di due tipi: *stretching* o stiramento (che consiste nella variazione della frequenza di allungamento e accorciamento del legame) e *bending* o piegamento (che riguarda le deformazioni degli angoli di legame sul piano e fuori dal piano) (Figura 17).



E' importante sottolineare che non tutte le transizioni vibrazionali che avvengono in un campione, possono essere individuate, ma solo quelle che provocano una variazione del momento dipolare (secondo delle precise Regole di Selezione). A tale proposito, le bande di assorbimento risultano ben evidenti (elevato coefficiente di estinzione molare) se il legame è polarizzato (ad esempio il carbonile), mentre sono più deboli o quasi assenti (basso coefficiente di estinzione molare) se il legame non presenta polarizzazione (doppio legame C=C).

Negli ultimi decenni, si è verificato un notevole ampliamento delle applicazioni della spettroscopia IR, dovuto principalmente allo sviluppo tecnologico. Grazie all'utilizzo della Trasformata di Fourier, è possibile acquisire contemporaneamente tutto il campo delle frequenze IR, diminuendo sensibilmente i tempi di acquisizione e permettendo di eseguire più scansioni sullo stesso campione, in modo da ottimizzare il rapporto segnale/rumore. La presenza all'interno del banco ottico dell'interferometro di Michelson (Figura 18), dotato di due specchi, uno fisso e l'altro mobile permette di generare tutte le frequenze IR, che interagendo con il campione producono un'interferogramma, che grazie alla Trasformata di Fourier viene convertito dal dominio dei tempi nel dominio delle frequenze.



**Figura 18:** Interferometro di Michelson.

## 4 PARTE SPERIMENTALE

### 4.1 Obiettivo dello studio

Lo studio sperimentale condotto per questa Tesi di Laurea si pone come obiettivo quello di valutare l'efficacia remineralizzante di tre dentifrici presenti in commercio, utilizzando come metodica di analisi la Microspettroscopia ATR-FTIR. I risultati, ottenuti dalle analisi, forniranno la base per una possibile ricerca clinica futura *in vivo* sull'efficacia di questi trattamenti mininvasivi per la remineralizzazione delle WSLs.

### 4.2 Materiali e Metodi

#### 4.2.1 Preparazione del campione

Quattro molari permanenti sono stati raccolti presso la Sezione di Stomatologia dell'Università Politecnica delle Marche di Ancona, Dipartimento DISCO. I denti sono stati estratti chirurgicamente per scopi terapeutici e i pazienti hanno firmato un consenso informato, secondo le linee guida del Comitato Etico Locale e la WMA - Dichiarazione di Helsinki (2018) [113]. Dopo l'estrazione chirurgica, i campioni sono stati lavati in un bagno ad ultrasuoni con acqua distillata per 2 minuti, al fine di rimuovere sangue e residui biologici. Tutti i campioni sono stati ispezionati visivamente da due clinici esperti, che hanno rilevato nella zona prossimale-vestibolare la presenza di aree di colore bianco senza danni superficiali, attribuibili a WSLs.

Secondo i principali criteri di classificazione delle lesioni cariose, le WSLs sono state definite come lesioni cariose incipienti attive dello smalto localizzate sulla superficie liscia di pazienti adulti [114]. I campioni sono stati conservati in una soluzione di Cloramina allo 0,5% (w/w) (NH<sub>2</sub>Cl) prima dell'inizio del trattamento. Dopo la raccolta dei denti, i campioni sono stati divisi in cinque gruppi (n=1) come segue:

- **Gruppo 1:** gruppo controllo, dente sano non trattato;
- **Gruppo 2:** dente con WSL non trattato;
- **Gruppo 3:** gruppo test, dente trattato con dentifricio Curaprox Enzycal;
- **Gruppo 4:** gruppo test, dente trattato con dentifricio Elmex Protezione carie;

- **Gruppo 5:** gruppo test, dente trattato con dentifricio Oral-B® Pro Expert.

Nella Tabella 2 sono riportate le composizioni dei prodotti utilizzati nello studio.

**Tabella 2: Materiali utilizzati nello studio con indicazione del produttore e composizione.**

MATERIALE	PRODUTTORE	COMPOSIZIONE
<b>Curaprox Enzycal</b> 	Curaprox, Svizzera	Fluoruro di sodio (1450 ppm)
<b>Elmex Protezione Carie</b> 	GABA, Therwil	Monofluorofosfato di sodio (1450 ppm) 1,5% arginina
<b>Oral-B® Pro Expert</b> 	Procter & Gamble, Stati Uniti	Fluoruro Stannoso (1450 ppm)

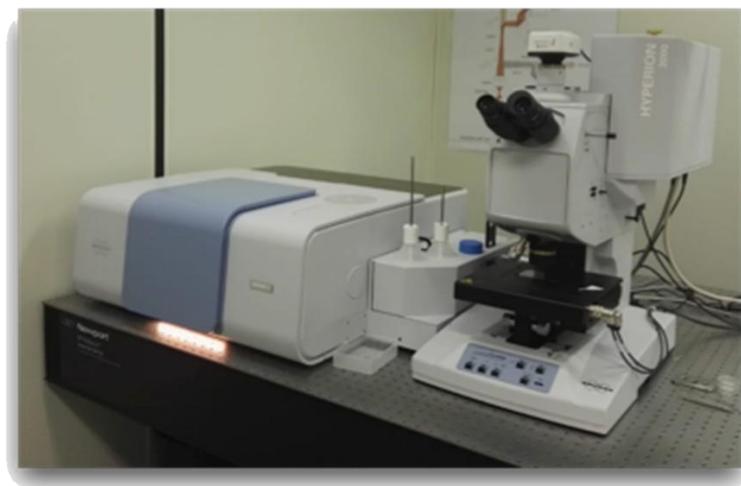
#### 4.2.2 *Trattamento dei campioni*

Il Gruppo 1 e Gruppo 2 sono stati conservati per l'intero studio in saliva artificiale, che è stata preparata come segue: 1,5 mM.L-1 di calcio, 0,9 mM.L-1 di fosfato, 150 mM.L-1 di cloruro di potassio in tampone cacodilico 0,02 mM.L-1, pH = 7,0; 0,02 µgF/mL e 1 mL/mm<sup>2</sup> [115].

I Gruppi 3, 4, 5 sono stati trattati 2 volte al giorno per 7 giorni con la pasta dentifricia in base al gruppo assegnato e dopo il trattamento sono stati conservati in saliva artificiale. Il trattamento con dentifricio è avvenuto mescolando manualmente un dentifricio in dose peanut-size (pari al volume di un coperchio standard di dentifricio) alla saliva artificiale (tre volte il volume del dentifricio) con una spatola di plastica ad una velocità di 30 rotazioni in 30 s. Pertanto, una parte di dentifricio è stata sciolta in tre parti di saliva artificiale (in rapporto di 1:3 gr/gr) per ottenere un impasto liquido omogeneo. La soluzione preparata è stata apposta sulla superficie della WSL e spazzolata per 120 s, 2 volte al giorno [116]. Questa procedura è stata scelta per riprodurre fedelmente la pratica quotidiana, in cui il dentifricio viene diluito nella secrezione salivare [117].

#### 4.2.3 *Analisi ATR-FTIR di campioni di denti*

Prima e dopo i trattamenti le aree con WSLs sono state analizzate attraverso la spettroscopia ATR-FTIR (Figura 19), eseguita presso il laboratorio ARI del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche.



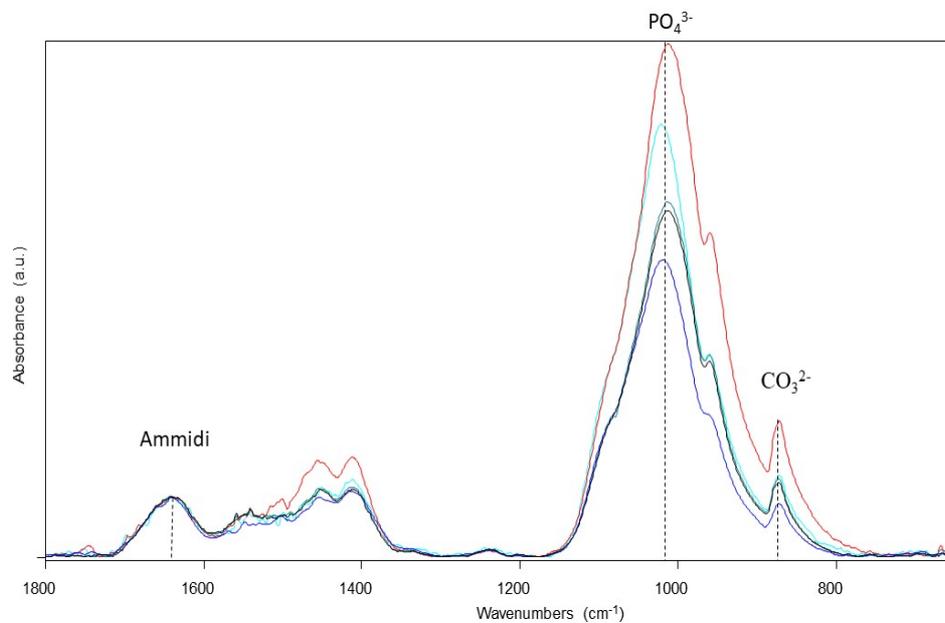
**Figura 19:** Spettroscopia ATR-FTIR

L'analisi spettroscopica è stata effettuata utilizzando un interferometro INVENIO-R accoppiato con l'accessorio Platinum ATR, equipaggiato con un cristallo di diamante e con un detector DTGS (Bruker Optics, Ettlingen, Germany). Per ogni campione, posizionato opportunamente sul cristallo di diamante, sono stati acquisiti 10 spettri ATR-FTIR nell'intervallo 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  (risoluzione spettrale 4  $\text{cm}^{-1}$ , 128 scansioni). Inoltre, prima di ogni campione, è stato acquisito lo spettro del background, utilizzando gli stessi parametri strumentali. Per ogni campione è stato calcolato lo spettro medio, che è stato quindi interpolato nell'intervallo spettrale 1800-750  $\text{cm}^{-1}$ , corretto per la linea di base e normalizzato vettorialmente (OPUS 7.0 software, Bruker Optics, Ettlingen, Germany).

## 4.3 Risultati

Per ogni campione sono stati acquisiti gli spettri ATR-FTIR, nell'intervallo spettrale 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . In Figura 20 sono riportati e messi a confronto i profili spettrali di ciascun Gruppo (1-5). Nelle Figure 21-25 sono riportati singolarmente gli spettri dei Gruppi 1-5. Le principali bande di assorbimento analizzate sono state:

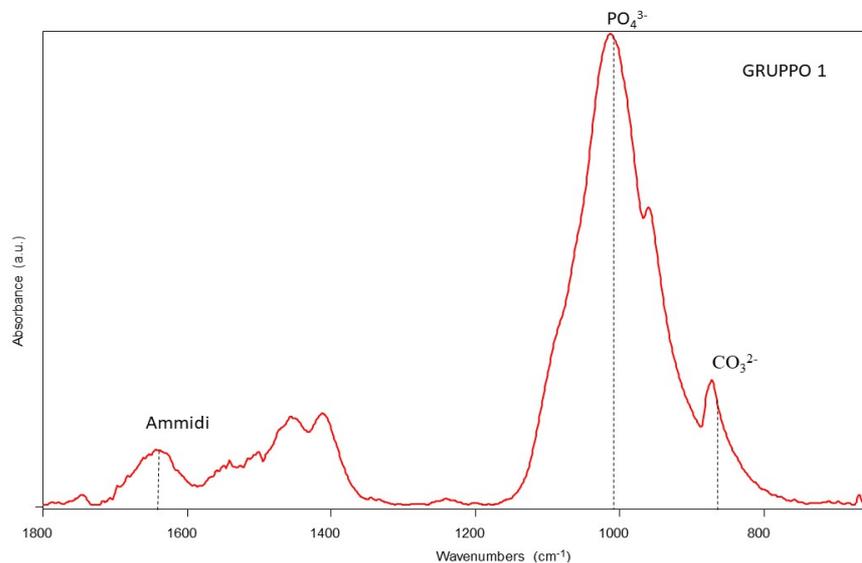
- la banda a  $\sim 1649$ , corrispondente alla componente amminica;
- la banda a  $\sim 1021$ , attribuibile al gruppo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ );
- la banda a  $\sim 872$ , attribuibile allo stretching del gruppo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ).



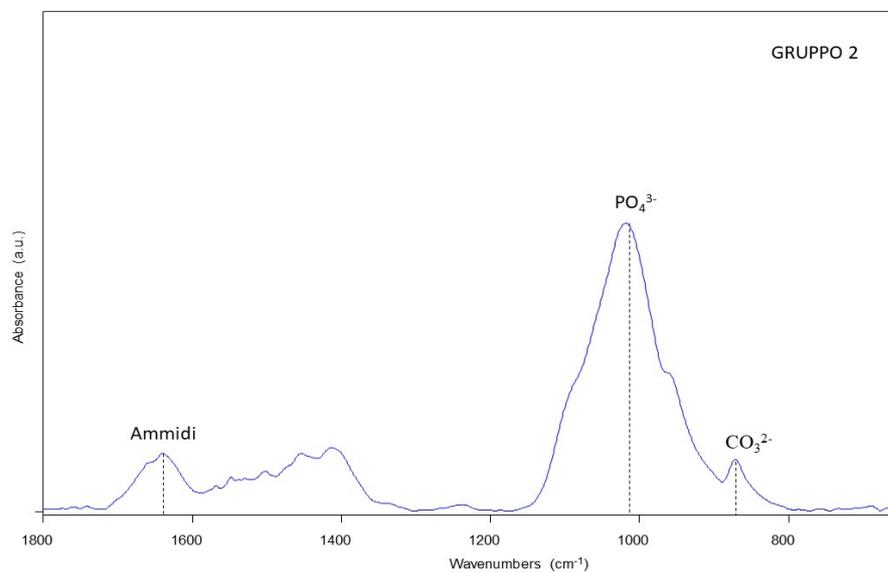
**Figura 20:** Profili spettrali ATR-FTIR dei seguenti gruppi: gruppo 1 (rosso), gruppo 2 (blu), gruppo 3(nero), gruppo 4 (azzurro), gruppo 5(verde acqua) . Le principali bande di assorbimento sono indicate da linee tratteggiate e si riferisco a: gruppo amminico, gruppo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), gruppo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ).

Dalla valutazione spettrale emerge che il gruppo amminico resta invariato in tutti i gruppi. Al contrario, il gruppo fosfato e il gruppo carbonato appaiono maggiori nel Gruppo 1 e con valori più bassi nel Gruppo 2. Per quanto riguarda i Gruppi 3-5, dopo il trattamento con i rispettivi dentifrici, il gruppo fosfato è risultato maggiore nel Gruppo

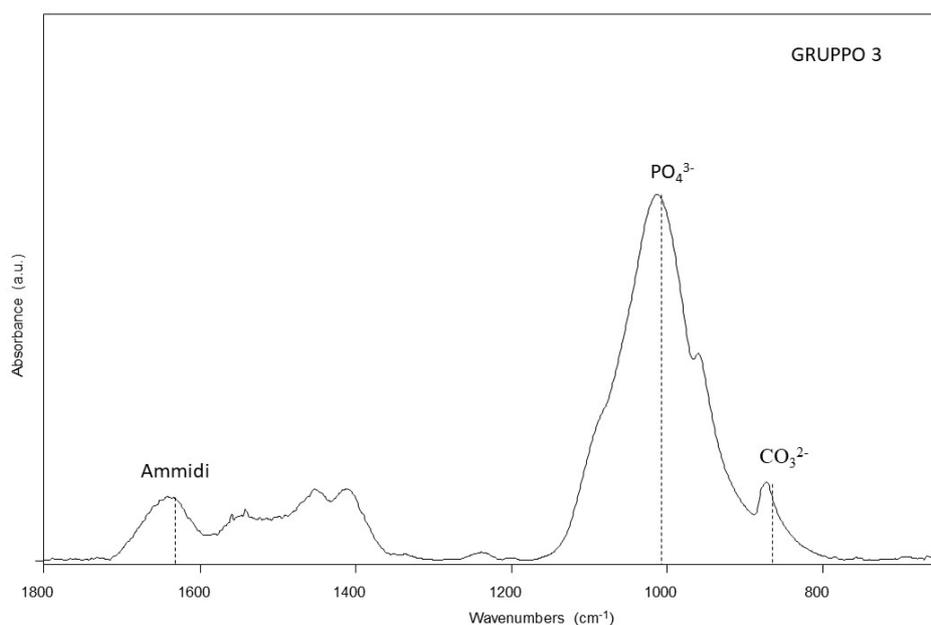
3, seguito dal Gruppo 4 ed infine dal Gruppo 5. Stesso andamento è apprezzabile per quanto riguarda il picco del gruppo carbonato.



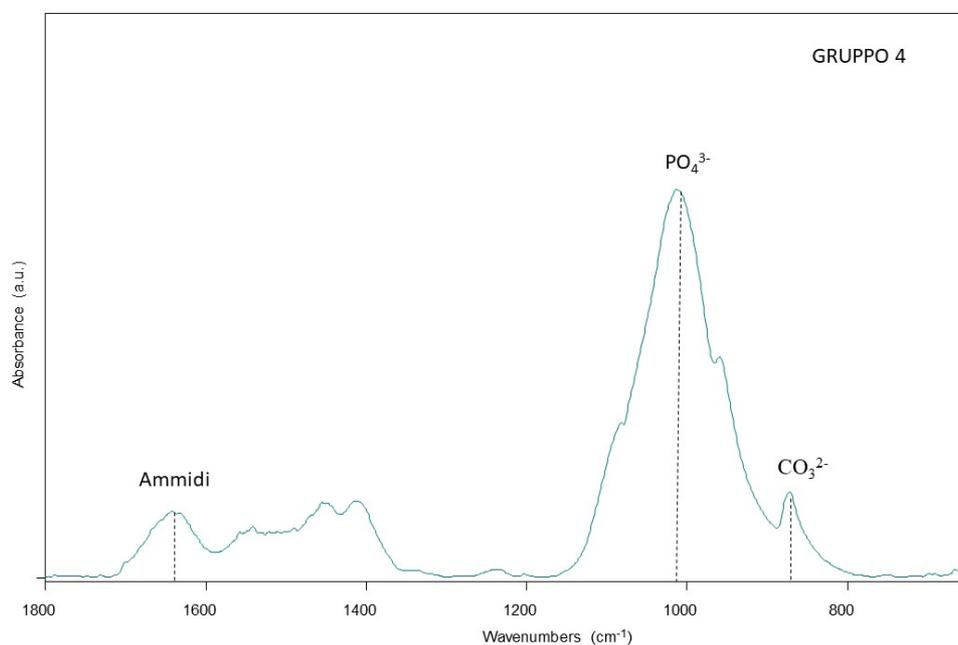
**Figura 21:** Spettro ATR-FTIR identificativo del gruppo 1 (rosso) e acquisito nell'intervallo 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . Le principali bande di assorbimento sono indicate da linee tratteggiate e si riferiscono a: gruppo amminico, gruppo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), gruppo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ).



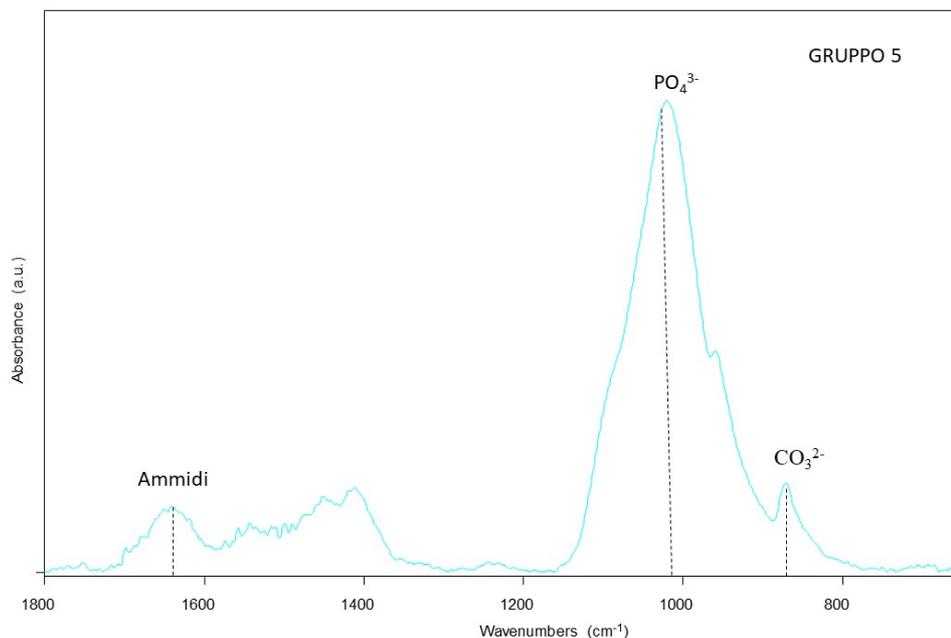
**Figura 22:** Spettro ATR-FTIR identificativo del Gruppo 2 (blu) e acquisito nell'intervallo 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . Le principali bande di assorbimento sono indicate da linee tratteggiate e si riferiscono a: gruppo amminico, gruppo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), gruppo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ).



**Figura 23:** Spettro ATR-FTIR identificativo del gruppo 3 (nero) e acquisito nell'intervallo 4000-600 cm<sup>-1</sup>. Le principali bande di assorbimento sono indicate da linee tratteggiate e si riferiscono a: gruppo amminico, gruppo fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), gruppo carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>).



**Figura 24:** Spettro ATR-FTIR identificativo del Gruppo 4 (azzurro) e acquisito nell'intervallo 4000-600 cm<sup>-1</sup>. Le principali bande di assorbimento sono indicate da linee tratteggiate e si riferiscono a: gruppo amminico, gruppo fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), gruppo carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>).



**Figura 25:** Spettro ATR-FTIR identificativo del gruppo 5 (verde acqua) e acquisito nell'intervallo 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . Le principali bande di assorbimento sono indicate da linee tratteggiate e si riferiscono a: gruppo amminico, gruppo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), gruppo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ).

## 4.4 Discussione

Le WSLs, al giorno d'oggi, costituiscono un argomento di notevole interesse in ambito odontoiatrico, in quanto rappresentano le fasi iniziali dello sviluppo della carie dentale. Nonostante la prevalenza di queste lesioni, l'eziologia, la struttura e la densità del gradiente minerale, sono ancora poco conosciute. La componente minerale del dente è costituita principalmente da calcio fosfato sotto forma di cristalli di idrossiapatite. Questi cristalli contengono una piccola quantità di elementi quali Cl, Mg, Cu, K, Fe, Sr e una grande quantità di ioni carbonato e fosfato [118].

In questo studio sperimentale è stato comparato il potere remineralizzante di tre diversi dentifrici presenti in commercio contenenti ciascuno 1450 ppm di fluoro.

Dai risultati ottenuti emerge che, nel Gruppo 1, il gruppo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e il gruppo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) sono maggiori rispetto a quelli del Gruppo 2, mentre il gruppo amminico resta invariato in entrambi. Questo aspetto può essere riferito al fatto che le

WSLs essendo demineralizzazioni superficiali non raggiungono lo strato della dentina [119].

L'analisi ATR-FTIR effettuata si basa sulla valutazione di due bande: la banda del fosfato (1021) e la banda del carbonato (872).

Per quanto riguarda i gruppi test, dopo il trattamento con i rispettivi dentifrici, i picchi del gruppo fosfato e del gruppo carbonato sono risultati maggiori nel Gruppo 3 (Curaprox Enzycal), seguito dal Gruppo 4 (Elmex Protezione carie) ed infine dal Gruppo 5 (Oral-B® Pro Expert).

I risultati ottenuti sono in linea con quelli riportati in letteratura in un recente studio, in cui la mappatura chimica dello smalto dentale è stata effettuata su sezioni trasversali di campioni con WSL sviluppati naturalmente e artificialmente [120]. In accordo con il nostro studio, gli autori hanno riportato una grave deplezione del picco del fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) nell'area corrispondente al corpo della lesione, mentre a distanze maggiori nello smalto, l'intensità del picco di fosfato converge a quella dello smalto sano, segnalando la fine della WSL.

Anche studi precedenti hanno portato agli stessi risultati. Lo studio di Fraser et al. e di Natarajan et al. infatti hanno dimostrato che lo smalto sano presenta la banda dei fosfati più intensa rispetto a quella riportata dalla WSL [121]. Come precedentemente sottolineato, i prodotti per l'igiene orale contenenti fluoro, utilizzati contro l'erosione dello smalto e della dentina potrebbero favorire la remineralizzazione [122].

Il fluoro è considerato dalla letteratura scientifica il trattamento gold standard per le lesioni demineralizzanti dello smalto dentale [123]. Presenta un'azione locale sull'interfaccia dente/placca, attraverso la promozione della remineralizzazione delle lesioni cariose precoci e la riduzione della solubilità dello smalto dei denti, aumentando l'accumulo di minerali [124]. Questo fenomeno si verifica con tutte le forme e concentrazioni di fluoro, anche se in misura variabile. Con trattamenti topici di fluoro ad alta concentrazione come vernici e gel, il fluoruro di calcio precipita sulla superficie dello smalto e nella placca. Il fluoruro di calcio funge da serbatoio di fluoro, che viene rilasciato quando il pH orale diminuisce [125]. Successivamente, i cristalli di idrossiapatite disciolti vengono sostituiti da cristalli di fluorapatite più resistenti durante la fase di remineralizzazione [11]. Dai risultati ottenuti, a differenza degli altri, il dentifricio contenente fluoruro di sodio (Curaprox Enzycal, Gruppo 3), presenta una

maggior capacità di incorporare fluoro nella struttura minerale dello smalto [126]. Infatti, tale dentifricio, avendo un pH leggermente acido, permette un'iniziale dissoluzione di minerali contenuti all'interno dello smalto superficiale e contemporaneamente la deposizione di Fluoro con la formazione di fluoro-idrossiapatite, piú resistente all'azione batterica [127].

Uno dei limiti di questa ricerca è il timing di 7 giorni usato nel protocollo di studio. Pertanto, un tempo piú lungo di trattamento con dentifrici sar  preso come punto di partenza per studi futuri. Inoltre, dobbiamo considerare i limiti del presente studio *in vitro*, in quanto   ancora lontano dal simulare le condizioni presenti nel cavo orale. Tuttavia, i risultati ottenuti restano incoraggianti in quanto dimostrano il potenziale remineralizzante di alcuni dentifrici sulla riorganizzazione dello smalto con WSL dopo 7 giorni di trattamento. I risultati ottenuti dalle analisi forniscono la base per una possibile ricerca clinica futura *in vivo* sull'efficacia di questi trattamenti mininvasivi per la remineralizzazione delle WSLs.

## 4.5 Conclusioni

Questo studio ha permesso di valutare le differenze a livello della caratterizzazione chimica tra smalto sano e WSL, e tra smalto con WSL prima e dopo il trattamento con tre dentifrici al fluoro (1450 ppm).

Dai risultati ottenuti con Spettroscopia ATR-FTIR,   stato dimostrato che nello smalto demineralizzato con WSL si ha una riduzione del gruppo fosfato e carbonato, mentre il picco dell'ammide rimane invariato. Invece, dopo i trattamenti con dentifrici fluorati, il picco del gruppo fosfato e del carbonato sono risultati maggiori nel Gruppo 3 (Curaprox Enzycal), seguito dal Gruppo 4 (Elmex Protezione carie) ed infine dal Gruppo 5 (Oral-B® Pro Expert). Pertanto, il dentifricio contenente fluoruro di sodio (Gruppo 3), presenta una maggior capacit  di incorporare fluoro nella struttura minerale dello smalto.

Quindi si pu  concludere che lo smalto con WSL mostra una struttura meno compatta, meno mineralizzata, con i cristalli di idrossiapatite disposti in maniera piú disordinata.

## 5 BIBLIOGRAFIA

- [1] Karlinsey, R.; Mackey, A.; Walker, E.; Amaechi, B.; Ramalingam, K.; Najibfard, K.; Pfarrer, A. Remineralization Potential of 5,000 Ppm Fluoride Dentifrices Evaluated in a PH Cycling Model. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene* 2010, 2, 1-6.
- [2] Katsaros C, Frencken JE, van't Hof MA, Kuijpers-Jagtman AM. Caries-inhibiting effect of preventive measures during orthodontic treatment with fixed appliances. A systematic review. *Caries Res* 2004;38:413–20. <https://doi.org/10.1159/000079621>.
- [3] Summitt JB. *Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach*. Quintessence Pub.; 2006.
- [4] Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod* 1982;81:93–8. [https://doi.org/10.1016/0002-9416\(82\)90032-x](https://doi.org/10.1016/0002-9416(82)90032-x).
- [5] Light microscope study of the effect of probing in occlusal surfaces - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3475183/> (accessed October 6, 2022).
- [6] Mahmoudzadeh M, Rezaei-Soufi L, Farhadian N, Jamalian SF, Akbarzadeh M, Momeni M, et al. Effect of CO2 Laser and Fluoride Varnish Application on Microhardness of Enamel Surface Around Orthodontic Brackets. *J Lasers Med Sci* 2018;9:43–9. <https://doi.org/10.15171/jlms.2018.10>.
- [7] Chen H, Liu X, Dai J, Jiang Z, Guo T, Ding Y. Effect of remineralizing agents on white spot lesions after orthodontic treatment: a systematic review. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 2013;143:376-382.e3. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2012.10.013>.
- [8] Recommendations for Using Fluoride to Prevent and Control Dental Caries in the United States n.d. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5014a1.htm> (accessed October 6, 2022).

- [9] Zabokova-Bilbilova E, Popovska L, Kapusevska B, Stefanovska E. White spot lesions: prevention and management during the orthodontic treatment. *Pril Makedon Akad Na Nauk Umet Oddelenie Za Med Nauki* 2014;35:161–8. <https://doi.org/10.2478/prilozi-2014-0021>.
- [10] Marinho VCC. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. *Eur Arch Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent* 2009;10:183–91. <https://doi.org/10.1007/BF03262681>.
- [11] Walsh T, Worthington HV, Glenny A-M, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD007868. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007868.pub2>.
- [12] Al-Mulla A, Karlsson L, Kharsa S, Kjellberg H, Birkhed D. Combination of high-fluoride toothpaste and no post-brushing water rinsing on enamel demineralization using an in-situ caries model with orthodontic bands. *Acta Odontol Scand* 2010;68:323–8. <https://doi.org/10.3109/00016357.2010.512863>.
- [13] Feng C, Chu X. [Efficacy of one year treatment of icon infiltration resin on post-orthodontic white spots]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2013;45:40–3.
- [14] Lee J, Okoye LO, Lima PP, Gakunga PT, Amaechi BT. Investigation of the esthetic outcomes of white spot lesion treatments. *Niger J Clin Pract* 2020;23:1312–7. [https://doi.org/10.4103/njcp.njcp\\_119\\_20](https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_119_20).
- [15] Rocha Gomes Torres C, Borges AB, Torres LMS, Gomes IS, de Oliveira RS. Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on the colour masking of white spot lesions. *J Dent* 2011;39:202–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.12.004>.
- [16] Bishara S, Ostby A. White Spot Lesions: Formation, Prevention, and Treatment. *Semin Orthod* 2008;14:174–82. <https://doi.org/10.1053/j.sodo.2008.03.002>.
- [17] Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. DENTAL ENAMEL FORMATION AND IMPLICATIONS FOR ORAL HEALTH AND DISEASE. *Physiol Rev* 2017;97:939–93. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>.

- [18] Farooq I, Bugshan A. The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. *F1000Research* 2020;9:171. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22499.3>.
- [19] Xu C, Yao X, Walker MP, Wang Y. Chemical/molecular structure of the dentin-enamel junction is dependent on the intratooth location. *Calcif Tissue Int* 2009;84:221–8. <https://doi.org/10.1007/s00223-008-9212-8>.
- [20] Moradian-Oldak J. The REGENERATION of TOOTH ENAMEL. *Dimens Dent Hyg* 2009;7:12–5.
- [21] Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent* 2013;2013:684607. <https://doi.org/10.1155/2013/684607>.
- [22] Robinson C, Kirkham J, Hallsworth AS. Volume distribution and concentration of protein, mineral and water in developing bovine enamel. *Arch Oral Biol* 1988;33:159–62. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(88\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0003-9969(88)90040-4).
- [23] Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol* 1998;9:128–61. <https://doi.org/10.1177/10454411980090020101>.
- [24] Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MAR. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci Rev FOB* 2009;17:75–86. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000200002>.
- [25] Aykut-Yetkiner A, Kara N, Ateş M, Ersin N, Ertuğrul F. Does casein phosphopeptid amorphous calcium phosphate provide remineralization on white spot lesions and inhibition of *Streptococcus mutans*? *J Clin Pediatr Dent* 2014;38:302–6. <https://doi.org/10.17796/jcpd.38.4.b4q401v6m4818215>.
- [26] Yoon RK, Best JM. Advances in pediatric dentistry. *Dent Clin North Am* 2011;55:419–32, vii. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2011.02.004>.
- [27] Wang XJ, Milner TE, de Boer JF, Zhang Y, Pashley DH, Nelson JS. Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography. *Appl Opt* 1999;38:2092–6. <https://doi.org/10.1364/ao.38.002092>.

- [28] Son J-H, Hur B, Kim H-C, Park J-K. Management of white spots: resin infiltration technique and microabrasion. *Restor Dent Endod* 2011;36. <https://doi.org/10.5395/JKACD.2011.36.1.66>.
- [29] Ekstrand KR, Ricketts DN, Kidd EA. Reproducibility and accuracy of three methods for assessment of demineralization depth of the occlusal surface: an in vitro examination. *Caries Res* 1997;31:224–31. <https://doi.org/10.1159/000262404>.
- [30] Ismail AI. Visual and visuo-tactile detection of dental caries. *J Dent Res* 2004;83 Spec No C:C56-66. <https://doi.org/10.1177/154405910408301s12>.
- [31] Dikmen B. Icdas II criteria (international caries detection and assessment system). *J Istanbul Univ Fac Dent* 2015;49:63. <https://doi.org/10.17096/jiufd.38691>.
- [32] Wu X, Wang J, Li Y-H, Yang Z-Y, Zhou Z. Association of molar incisor hypomineralization with premature birth or low birth weight: systematic review and meta-analysis. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet* 2020;33:1700–8. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1527310>.
- [33] Americano GCA, Jacobsen PE, Soviero VM, Haubek D. A systematic review on the association between molar incisor hypomineralization and dental caries. *Int J Paediatr Dent* 2017;27:11–21. <https://doi.org/10.1111/ipd.12233>.
- [34] Bonar LC, Shimizu M, Roberts JE, Griffin RG, Glimcher MJ. Structural and composition studies on the mineral of newly formed dental enamel: a chemical, x-ray diffraction, and <sup>31</sup>P and proton nuclear magnetic resonance study. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1991;6:1167–76. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650061105>.
- [35] Fagrell TG, Dietz W, Jälevik B, Norén JG. Chemical, mechanical and morphological properties of hypomineralized enamel of permanent first molars. *Acta Odontol Scand* 2010;68:215–22. <https://doi.org/10.3109/00016351003752395>.
- [36] Elhennawy K, Schwendicke F. Managing molar-incisor hypomineralization: A systematic review. *J Dent* 2016;55:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.09.012>.

- [37] Bandeira Lopes L, Machado V, Botelho J, Haubek D. Molar-incisor hypomineralization: an umbrella review. *Acta Odontol Scand* 2021;79:359–69. <https://doi.org/10.1080/00016357.2020.1863461>.
- [38] da Cunha Coelho ASE, Mata PCM, Lino CA, Macho VMP, Areias CMFGP, Norton APMAP, et al. Dental hypomineralization treatment: A systematic review. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent AI* 2019;31:26–39. <https://doi.org/10.1111/jerd.12420>.
- [39] Structural, mechanical and chemical evaluation of molar-incisor hypomineralization-affected enamel: A systematic review - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28843745/> (accessed October 6, 2022).
- [40] Schwendicke F, Elhennawy K, Reda S, Bekes K, Manton DJ, Krois J. Global burden of molar incisor hypomineralization. *J Dent* 2018;68:10–8. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.12.002>.
- [41] Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralisation (MIH). *Eur J Paediatr Dent* 2003;4:114–20.
- [42] Lygidakis NA, Wong F, Jälevik B, Vierrou A-M, Alaluusua S, Espelid I. Best Clinical Practice Guidance for clinicians dealing with children presenting with Molar-Incisor-Hypomineralisation (MIH): An EAPD Policy Document. *Eur Arch Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent* 2010;11:75–81. <https://doi.org/10.1007/BF03262716>.
- [43] William V, Messer LB, Burrow MF. Molar incisor hypomineralization: review and recommendations for clinical management. *Pediatr Dent* 2006;28:224–32.
- [44] Weerheijm KL, Duggal M, Mejàre I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens LC, et al. Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *Eur J Paediatr Dent* 2003;4:110–3.
- [45] Hernandez M, Boj JR, Espasa E. Do We Really Know the Prevalence of MIH? *J Clin Pediatr Dent* 2016;40:259–63. <https://doi.org/10.17796/1053-4628-40.4.259>.

- [46] Saitoh M, Shintani S. Molar incisor hypomineralization: A review and prevalence in Japan. *Jpn Dent Sci Rev* 2021;57:71–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.05.001>.
- [47] Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM, Manton DJ, Kilpatrick N. Etiology of molar incisor hypomineralization - A systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol* 2016;44:342–53. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12229>.
- [48] Vieira AR, Kup E. On the Etiology of Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res* 2016;50:166–9. <https://doi.org/10.1159/000445128>.
- [49] Teixeira RJPB, Andrade NS, Queiroz LCC, Mendes FM, Moura MS, Moura L de FA de D, et al. Exploring the association between genetic and environmental factors and molar incisor hypomineralization: evidence from a twin study. *Int J Paediatr Dent* 2018;28:198–206. <https://doi.org/10.1111/ipd.12327>.
- [50] Garg N, Jain AK, Saha S, Singh J. Essentiality of early diagnosis of molar incisor hypomineralization in children and review of its clinical presentation, etiology and management. *Int J Clin Pediatr Dent* 2012;5:190–6. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1164>.
- [51] Willmott NS, Bryan R a. E, Duggal MS. Molar-incisor-hypomineralisation: a literature review. *Eur Arch Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent* 2008;9:172–9. <https://doi.org/10.1007/BF03262633>.
- [52] Kilpatrick N, Mahoney EK. Dental erosion: part 2. The management of dental erosion. *N Z Dent J* 2004;100:42–7.
- [53] Fejerskov O, Manji F, Baelum V. The nature and mechanisms of dental fluorosis in man. *J Dent Res* 1990;69 Spec No:692–700; discussion 721. <https://doi.org/10.1177/00220345900690S135>.
- [54] Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev* 2015;4:1. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>.
- [55] Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies

that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med* 2009;6:e1000100. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000100>.

[56] Bertassoni LE, Martin JMH, Torno V, Vieira S, Rached RN, Mazur RF. In-office dental bleaching and enamel microabrasion for fluorosis treatment. *J Clin Pediatr Dent* 2008;32:185–7. <https://doi.org/10.17796/jcpd.32.3.20757r27312334u8>.

[57] Khandelwal V, Nayak UA, Nayak PA, Ninawe N. Aesthetic management of dental fluorosis. *BMJ Case Rep* 2013;2013:bcr2013010029. <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-010029>.

[58] Akpata ES. Occurrence and management of dental fluorosis. *Int Dent J* 2001;51:325–33. <https://doi.org/10.1002/j.1875-595x.2001.tb00845.x>.

[59] Aoba T, Fejerskov O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol* 2002;13:155–70. <https://doi.org/10.1177/154411130201300206>.

[60] Bharath KP, Subba Reddy VV, Poornima P, Revathy V, Kambalimath HV, Karthik B. Comparison of relative efficacy of two techniques of enamel stain removal on fluorosed teeth. An in vivo study. *J Clin Pediatr Dent* 2014;38:207–13. <https://doi.org/10.17796/jcpd.38.3.0h120nkl8852p568>.

[61] Robinson C, Connell S, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Smith AM. The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Res* 2004;38:268–76. <https://doi.org/10.1159/000077766>.

[62] Ng F, Manton DJ. Aesthetic management of severely fluorosed incisors in an adolescent female. *Aust Dent J* 2007;52:243–8. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00495.x>.

[63] Bertassoni LE, Martin JMH, Torno V, Vieira S, Rached RN, Mazur RF. In-office dental bleaching and enamel microabrasion for fluorosis treatment. *J Clin Pediatr Dent* 2008;32:185–7. <https://doi.org/10.17796/jcpd.32.3.20757r27312334u8>.

[64] Celik EU, Yildiz G, Yazkan B. clinical evaluation of enamel microabrasion for the aesthetic management of mild-to-severe dental fluorosis. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent AI* 2013;25:422–30. <https://doi.org/10.1111/jerd.12052>.

- [65] Gugnani N, Pandit IK, Gupta M, Gugnani S, Soni S, Goyal V. Comparative evaluation of esthetic changes in nonpitted fluorosis stains when treated with resin infiltration, in-office bleaching, and combination therapies. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent Al* 2017;29:317–24. <https://doi.org/10.1111/jerd.12312>.
- [66] Di Giovanni T, Eliades T, Papageorgiou SN. Interventions for dental fluorosis: A systematic review. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent Al* 2018;30:502–8. <https://doi.org/10.1111/jerd.12408>.
- [67] Train TE, McWhorter AG, Seale NS, Wilson CF, Guo IY. Examination of esthetic improvement and surface alteration following microabrasion in fluorotic human incisors in vivo. *Pediatr Dent* 1996;18:353–62.
- [68] Paris S, Meyer-Lueckel H. Masking of labial enamel white spot lesions by resin infiltration--a clinical report. *Quintessence Int Berl Ger* 1985 2009;40:713–8.
- [69] Muñoz MA, Arana-Gordillo LA, Gomes GM, Gomes OM, Bombarda NHC, Reis A, et al. Alternative esthetic management of fluorosis and hypoplasia stains: blending effect obtained with resin infiltration techniques. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent Al* 2013;25:32–9. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2012.00527.x>.
- [70] Altun C, Cehreli ZC, Güven G, Acikel C. Traumatic intrusion of primary teeth and its effects on the permanent successors: a clinical follow-up study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:493–8. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.10.016>.
- [71] Andreasen JO, Sundström B, Ravn JJ. The effect of traumatic injuries to primary teeth on their permanent successors. I. A clinical and histologic study of 117 injured permanent teeth. *Scand J Dent Res* 1971;79:219–83. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1971.tb02013.x>.
- [72] Lambrechts P, Mattar D, De Munck J, Bergmans L, Peumans M, Vanherle G, et al. Air-abrasion enamel microsurgery to treat enamel white spot lesions of traumatic origin. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent Al* 2002;14:167–87. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2002.tb00517.x>.

- [73] Andreasen JO. The influence of traumatic intrusion of primary teeth on their permanent successors. A radiographic and histologic study in monkeys. *Int J Oral Surg* 1976;5:207–19. [https://doi.org/10.1016/s0300-9785\(76\)80016-6](https://doi.org/10.1016/s0300-9785(76)80016-6).
- [74] 6 Oral Microbiological Changes, Long-Term Enamel Alterations Due to Decalcification, and Caries Prophylactic Aspects. 2001st ed. Thieme Verlag; 2001. <https://doi.org/10.1055/b-0034-43094>.
- [75] Chapman JA, Roberts WE, Eckert GJ, Kula KS, González-Cabezas C. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 2010;138:188–94. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2008.10.019>.
- [76] Pl N, Mt F, Fe F, Al F-E-S. Fluoride-Releasing Materials to Prevent White Spot Lesions around Orthodontic Brackets: A Systematic Review. *Braz Dent J* 2016;27. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600482>.
- [77] Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 2011;90:294–303. <https://doi.org/10.1177/0022034510379602>.
- [78] Yetkiner E, Wegehaupt F, Wiegand A, Attin R, Attin T. Colour improvement and stability of white spot lesions following infiltration, micro-abrasion, or fluoride treatments in vitro. *Eur J Orthod* 2014;36:595–602. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjt095>.
- [79] Tufekci E, Dixon JS, Gunsolley JC, Lindauer SJ. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *Angle Orthod* 2011;81:206–10. <https://doi.org/10.2319/051710-262.1>.
- [80] Cosma LL, Şuhani RD, Mesaroş A, Badea ME. Current treatment modalities of orthodontically induced white spot lesions and their outcome - a literature review. *Med Pharm Rep* 2019;92:25–30. <https://doi.org/10.15386/cjmed-1090>.
- [81] Whitford GM. Acute and chronic fluoride toxicity. *J Dent Res* 1992;71:1249–54. <https://doi.org/10.1177/00220345920710051901>.
- [82] Lee Y. Diagnosis and Prevention Strategies for Dental Caries. *J Lifestyle Med* 2013;3:107–9.

- [83] Landry RG, Jean M. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. *Int Dent J* 2002;52:35–40. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2002.tb00595.x>.
- [84] Relazione tra salute orale e aprassia costruttiva in pazienti anziani ospedalizzati: studio osservazionale - *Rivista Italiana Igiene Dentale* n.d. <https://www.rivistaitalianaigienedentale.it/relazione-salute-orale-aprassia-costruttiva-pazienti-anziani-ospedalizzati-studio-osservazionale/> (accessed October 6, 2022).
- [85] Redazione. Valutazione degli indici epidemiologici orali in relazione alle caratteristiche della saliva. *Riv Ital Ig Dent* 2017. <https://www.rivistaitalianaigienedentale.it/valutazione-degli-indici-epidemiologici-orali-relazione-alle-caratteristiche-della-saliva/> (accessed October 6, 2022).
- [86] Manuale pratico per l'igienista dentale n.d. <https://www.medicalinformation.it/manuale-pratico-per-l-igienista-dentale-genovesi-sanavia-nardi-see-editore.html> (accessed October 6, 2022).
- [87] Carrotte P. Endodontics: Part 2 Diagnosis and treatment planning. *Br Dent J* 2004;197:231–8. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4811612>.
- [88] Sherwood IA. Pre-operative diagnostic radiograph interpretation by general dental practitioners for root canal treatment. *Dento Maxillo Facial Radiol* 2012;41:43–54. <https://doi.org/10.1259/dmfr/26466415>.
- [89] Chan M, Dadul T, Langlais R, Russell D, Ahmad M. Accuracy of extraoral bite-wing radiography in detecting proximal caries and crestal bone loss. *J Am Dent Assoc* 1939 2018;149:51–8. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2017.08.032>.
- [90] Horner K. Radiographic selection criteria: new guidelines, old challenges. *Br Dent J* 2013;214:201–3. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.158>.
- [91] Benassi E. Indagini con differenti tecnologie RX. Dose per paziente. triennale. 2012.
- [92] Tubert-Jeannin S, Auclair C, Amsallem E, Tramini P, Gerbaud L, Ruffieux C, et al. Fluoride supplements (tablets, drops, lozenges or chewing gums) for preventing

dental caries in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD007592. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007592.pub2>.

[93] Linee guida nazionali per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali negli individui in età evolutiva che devono essere sottoposti a terapia chemio e/o radio n.d. [https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6\\_2\\_2\\_1.jsp?lingua=italiano&id=2730](https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?lingua=italiano&id=2730) (accessed October 6, 2022).

[94] Hoffman DA, Clark AE, Rody WJ, McGorray SP, Wheeler TT. A prospective randomized clinical trial into the capacity of a toothpaste containing NovaMin to prevent white spot lesions and gingivitis during orthodontic treatment. *Prog Orthod* 2015;16:25. <https://doi.org/10.1186/s40510-015-0095-8>.

[95] Alexander SA, Ripa LW. Effects of self-applied topical fluoride preparations in orthodontic patients. *Angle Orthod* 2000;70:424–30. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(2000\)070<0424:EOSATF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(2000)070<0424:EOSATF>2.0.CO;2).

[96] Ogaard B. Prevalence of white spot lesions in 19-year-olds: a study on untreated and orthodontically treated persons 5 years after treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 1989;96:423–7. [https://doi.org/10.1016/0889-5406\(89\)90327-2](https://doi.org/10.1016/0889-5406(89)90327-2).

[97] Basdra EK, Huber H, Komposch G. Fluoride released from orthodontic bonding agents alters the enamel surface and inhibits enamel demineralization in vitro. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 1996;109:466–72. [https://doi.org/10.1016/s0889-5406\(96\)70130-0](https://doi.org/10.1016/s0889-5406(96)70130-0).

[98] Linton JL. Quantitative measurements of remineralization of incipient caries. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 1996;110:590–7. [https://doi.org/10.1016/s0889-5406\(96\)80034-5](https://doi.org/10.1016/s0889-5406(96)80034-5).

[99] Benson PE, Pender N, Higham SM. Quantifying enamel demineralization from teeth with orthodontic brackets--a comparison of two methods. Part 2: validity. *Eur J Orthod* 2003;25:159–65. <https://doi.org/10.1093/ejo/25.2.159>.

[100] Hirschfield RE. Control of decalcification by use of fluoride mouthrinse. *ASDC J Dent Child* 1978;45:458–60.

- [101] LeCompte EJ, Doyle TE. Effects of suctioning devices on oral fluoride retention. *J Am Dent Assoc* 1939 1985;110:357–60. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1985.0336>.
- [102] Huang X, Wei F, Hu L, Wen L, Chen K. Epidemiology and Clinical Characteristics of COVID-19. *Arch Iran Med* 2020;23:268–71. <https://doi.org/10.34172/aim.2020.09>.
- [103] Rose RK. Binding characteristics of *Streptococcus mutans* for calcium and casein phosphopeptide. *Caries Res* 2000;34:427–31. <https://doi.org/10.1159/000016618>.
- [104] Karabekiroğlu S, Ünlü N, Küçükyılmaz E, Şener S, Botsali MS, Malkoç S. Treatment of post-orthodontic white spot lesions with CPP-ACP paste: A three year follow up study. *Dent Mater J* 2017;36:791–7. <https://doi.org/10.4012/dmj.2016-228>.
- [105] Verma SK, Maheshwari S, Singh RK, Chaudhari PK. Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. *Natl J Maxillofac Surg* 2012;3:124–32. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.111342>.
- [106] Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell GL. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO<sub>2</sub> laser irradiation. *J Dent Res* 1992;71:1389–98. <https://doi.org/10.1177/00220345920710070701>.
- [107] Senestraro SV, Crowe JJ, Wang M, Vo A, Huang G, Ferracane J, et al. Minimally invasive resin infiltration of arrested white-spot lesions: a randomized clinical trial. *J Am Dent Assoc* 1939 2013;144:997–1005. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2013.0225>.
- [108] Kim Y, Son HH, Yi K, Ahn JS, Chang J. Bleaching Effects on Color, Chemical, and Mechanical Properties of White Spot Lesions. *Oper Dent* 2016;41:318–26. <https://doi.org/10.2341/15-015-L>.
- [109] Khoroushi M, Mazaheri H, Saneie T, Samimi P. Fracture toughness of bleached enamel: Effect of applying three different nanobiomaterials by nanoindentation test. *Contemp Clin Dent* 2016;7:209–15. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.183047>.
- [110] Guzmán-Armstrong S, Chalmers J, Warren JJ. Ask us. White spot lesions: prevention and treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its*

Const Soc Am Board Orthod 2010;138:690–6.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.07.007>.

[111] Mota SM, Enoki C, Ito IY, Elias AM, Matsumoto MAN. Streptococcus mutans counts in plaque adjacent to orthodontic brackets bonded with resin-modified glass ionomer cement or resin-based composite. *Braz Oral Res* 2008;22:55–60. <https://doi.org/10.1590/s1806-83242008000100010>.

[112] Denis M, Atlan A, Vennat E, Tirlet G, Attal J-P. White defects on enamel: diagnosis and anatomopathology: two essential factors for proper treatment (part 1). *Int Orthod* 2013;11:139–65. <https://doi.org/10.1016/j.ortho.2013.02.014>.

[113] WMA - The World Medical Association-WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects n.d. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

[114] Fejerskov O, Kidd E, editors. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. 2nd edition. Oxford; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2008.

[115] Fernandes NLS, Juliellen L da C, Andressa FB de O, D’Alpino HPP, Sampaio CF. Resistance against Erosive Challenge of Dental Enamel Treated with 1,450-PPM Fluoride Toothpastes Containing Different Biomimetic Compounds. *Eur J Dent* 2021;15:433–9. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1725576>.

[116] Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent* 2011;39:430–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.03.008>.

[117] Duke SA, Forward GC. The conditions occurring in vivo when brushing with toothpastes. *Br Dent J* 1982;152:52–4. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4804743>.

[118] Makarova NE, Vinnichenko YA. [Local enamel demineralization diagnostics and treatment]. *Stomatologiya (Sofia)* 2017;96:67–71. <https://doi.org/10.17116/stomat201796467-71>.

- [119] Moraschini V, da Costa LS, Dos Santos GO. Effectiveness for dentin hypersensitivity treatment of non-cariou cervical lesions: a meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2018;22:617–31. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2330-9>.
- [120] Al-Obaidi R, Salehi H, Desoutter A, Bonnet L, Etienne P, Terrer E, et al. Chemical & Nano-mechanical Study of Artificial Human Enamel Subsurface Lesions. *Sci Rep* 2018;8:4047. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22459-7>.
- [121] Fraser SJ, Natarajan AK, Clark ASS, Drummond BK, Gordon KC. A Raman spectroscopic study of teeth affected with molar–incisor hypomineralisation. *J Raman Spectrosc* 2015;46:202–10. <https://doi.org/10.1002/jrs.4635>.
- [122] Roveri N, Battistella E, Bianchi CL, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, et al. Surface Enamel Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions Different Effects. *J Nanomater* 2009;2009:e746383. <https://doi.org/10.1155/2009/746383>.
- [123] Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Medica Acad* 2013;42:179–88. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.85>.
- [124] ten Cate JM, Timmer K, Shariati M, Featherstone JD. Effect of timing of fluoride treatment on enamel de- and remineralization in vitro: a pH-cycling study. *Caries Res* 1988;22:20–6. <https://doi.org/10.1159/000261078>.
- [125] Horowitz HS. The effectiveness of community water fluoridation in the United States. *J Public Health Dent* 1996;56:253–8. <https://doi.org/10.1111/j.1752-7325.1996.tb02448.x>.
- [126] Creeth JE, Burnett GR, Souverain A, Gomez-Pereira P, Zero DT, Lippert F, et al. In situ efficacy of an experimental toothpaste on enamel rehardening and prevention of demineralisation: a randomised, controlled trial. *BMC Oral Health* 2020;20:118. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01081-y>.
- [127] Lussi A, Jaeggi T. [The erosive potential of various oral care products compared to foodstuffs and beverages]. *Schweiz Monatsschrift Zahnmed Rev Mens Suisse Odonto-Stomatol Riv Mens Svizzera Odontol E Stomatol* 2001;111:274–81.

