



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Igiene Dentale
Presidente: Prof. Angelo Putignano

Analisi comparative di potenziali agenti remineralizzanti su lesioni superficiali dello smalto

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

Candidato:
Linda Faccendi

Correlatore:
**Prof.ssa Scilla Sparabombe
Dott. Riccardo Monterubbianesi**

Anno Accademico 2020-2021

Indice

Introduzione	1
1 Istoaanomia dei tessuti duri del dente	3
1.1 Lo smalto.....	4
1.2 La dentina.....	6
1.3 Il cemento.....	9
2 La demineralizzazione.....	11
2.1 Eziologia della demineralizzazione.....	12
2.1.1 Spazzolamento dei denti	12
2.1.2 Bruxismo.....	12
2.1.3 Acidi intrinseci.....	13
2.1.4 Acidi estrinseci	13
2.2 Manifestazioni cliniche	15
2.2.1 White spot lesions.....	15
2.2.2 Cavità cariose.....	16
2.2.3 Sensibilità dentale	17
3 La remineralizzazione	19
3.1 Il fluoro.....	21
3.2 Fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo (CCP-ACP).....	23
3.3 Nano-idrossiapatite	25
4 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)	27

Protocollo sperimentale.....	28
5 Obiettivo.....	28
6 Materiali e metodi	28
6.1 Preparazione del campione	28
6.2 Analisi SEM-EDS.....	29
6.3 Analisi Statistica.....	30
7 Risultati	31
8 Discussione.....	36
9 Conclusione.....	39
10 Bibliografia	40

Introduzione

Lo smalto, la dentina e il cemento rappresentano i tessuti duri del dente e sono costituiti sia da una componente organica che da una componente inorganica in percentuali differenti. (Abou Neel et al., 2016). La componente inorganica di questi tessuti mineralizzati è composta principalmente da idrossiapatite (HA), minerale che conferisce durezza e resistenza. L'HA, composta da ioni calcio e fosfato $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, svolge un ruolo importante nei processi di demineralizzazione e remineralizzazione e di conseguenza nel modificare la suscettibilità del dente alla progressione della carie (Hara & Zero, 2010).

La demineralizzazione è il processo di perdita degli ioni minerali dai cristalli di HA a causa di diversi fattori. La demineralizzazione dei tessuti duri del dente è il presupposto fondamentale all'insorgenza della carie dentale, patologia ad eziologia multifattoriale molto diffusa, che colpisce circa tre miliardi di persone nel mondo. La malattia cariosa inizia con un'alterazione della popolazione microbica adiacente alla superficie dei denti, che diventa ad alto potenziale cariogeno; tale popolazione produce acidi che abbassano il pH del cavo orale, portandolo al di sotto del livello critico di 5,5 e causando una netta perdita di minerali (Takahashi & Nyvad, 2011).

Al contrario, il ripristino di questi ioni minerali nei cristalli di HA prende il nome di remineralizzazione (Abou Neel et al., 2016). Infatti la remineralizzazione dei tessuti dentali duri è definita come il processo mediante il quale vengono forniti ioni calcio e ioni fosfato da una sorgente esterna al dente, per favorire la deposizione ionica all'interno della struttura dei prismi, privi dei cristalli a causa della demineralizzazione (Cochrane et al., 2010).

Attraverso questo processo è possibile arrestare e prevenire la malattia cariosa; infatti gli agenti remineralizzanti agiscono sia sui batteri ad alto potenziale cariogeno del biofilm, che sui tessuti duri, restituendo la quota di minerali persi; diminuendo così l'incidenza globale di carie (Bijle et al., 2021).

Da decenni il fluoro, ad uso topico e sistemico, è considerato la pietra angolare nel processo di remineralizzazione, ma la sua capacità di promuovere la rete di remineralizzazione è limitata dalla disponibilità di ioni calcio e fosfato (Gao et al., 2016). I fluoruri promuovono

la remineralizzazione e inibiscono la demineralizzazione mediante la formazione di cristalli di fluoroapatite dello smalto, molto resistenti agli acidi.

Oltre al fluoro, per ottenere la remineralizzazione dei tessuti duri, vi sono anche prodotti contenenti fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP) che funge da serbatoio di ioni calcio e fosforo permettendo la remineralizzazione degli strati più profondi dello smalto (Cai et al., 2009).

Infine, possono essere anche utilizzati composti contenenti nano-idrossiapatite, la quale fornisce gli ioni necessari a ridurre la demineralizzazione, avendo inoltre anche la capacità di legarsi con frammenti di placca e batteri. (Bordea et al., 2020).

L'obiettivo di questa Tesi di Laurea è di valutare la remineralizzazione dei cristalli di HA della superficie dello smalto ed osservarne i cambiamenti della composizione chimica in seguito all'applicazione di agenti remineralizzanti contenenti diverse molecole con capacità remineralizzante.

1 Istioanatomia dei tessuti duri del dente

Ogni elemento dentale è costituito da due componenti anatomiche: la “corona”, parte superiore e visibile nella cavità orale, e la “radice”, parte inferiore non visibile, inserita all’interno dell’alveolo osseo mascellare o mandibolare. La parte più esterna della corona è ricoperta da “smalto”, la sostanza più dura del corpo. Al di sotto dello smalto troviamo “la dentina”, tessuto maggiormente presente nel dente che può diventare sensibile se, a causa di fattori di varia natura, si perde lo smalto esterno protettivo. Nella parte più interna del dente è presente un tessuto connettivo molle che contiene cellule, vasi e terminazioni nervose, la “polpa dentale”, che costituisce il core del dente e si continua fino ai canali radicolari, ricoperti, a loro volta, da dentina radicolare e da uno strato sottile esterno, il “cemento” che, insieme al legamento parodontale, aiuta ad ancorare il dente all’osso alveolare (Madani et al., 2014). (Figura 1)

Lo smalto, la dentina e il cemento sono composti in proporzioni differenti da una matrice organica, e da una componente inorganica, formata da idrossiapatite, che conferisce durezza e resistenza al tessuto (Abou Neel et al., 2016).

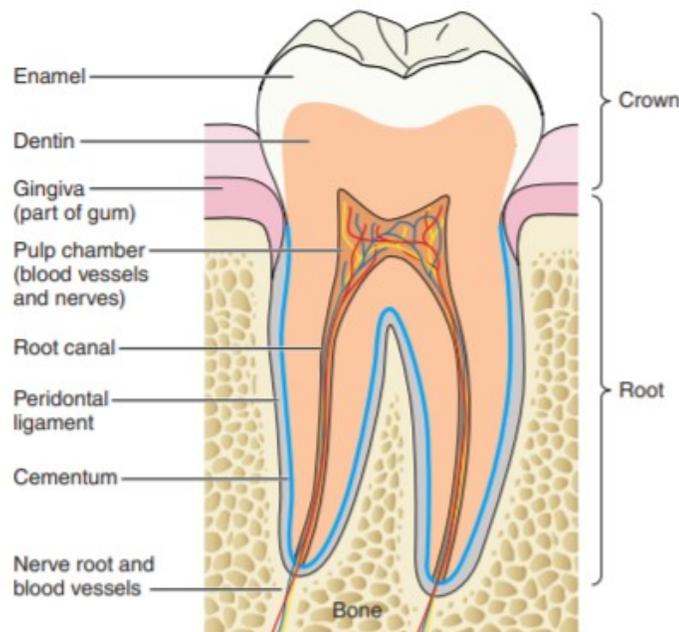


Figura 1. Anatomia dentale di un molare mandibolare (R.S. Lacruz et al., 2017).

1.1 Lo smalto

Lo smalto dentale è la sostanza più dura del corpo umano e funge da strato esterno della corona, garantendo un'elevata resistenza all'usura. Esso forma una barriera isolante che protegge il dente da stimoli fisici, termici e chimici, che potrebbero essere dannosi per la componente vitale, costituita dal complesso pulpo-dentale sottostante (Lacruz et al., 2017). È un tessuto acellulare di origine ectodermica, prodotto dagli ameloblasti che vengono persi durante l'eruzione del dente umano, composto per il 96-97% in peso da materiale inorganico mineralizzato e per il 3-4% da proteine non collageniche, enzimi e acqua. Inoltre, ha proprietà uniche, tra cui l'elevata durezza e cristallinità che conferiscono la sua eccezionale resistenza all'usura (Cui & Ge, 2007).

Lo smalto è costituito principalmente da cristalli di idrossiapatite, contenenti calcio, fosfato e ioni ossidrilici, organizzati in strutture prismatiche che si estendono dalla giunzione amelodentale fino alla superficie esterna dello smalto. La parte reattiva della struttura dell'idrossiapatite è la colonna di ioni ossidrilici paralleli all'asse lungo del cristallo. La mancanza di alcuni ioni ossidrilici consente un maggiore movimento ionico all'interno della colonna, aumentando quindi la sua reattività chimica (Weatherell, 1975).

Nello smalto esterno, i cristalli di idrossiapatite hanno un orientamento uniforme, mentre nello smalto interno presentano un orientamento non uniforme; per questo lo smalto interno mostra una maggiore resistenza alla frattura rispetto allo smalto esterno (He & Swain, 2008). Inoltre, nella componente inorganica, sono contenute anche minime tracce di altri elementi come sodio (Na), magnesio (Mg), stronzio (Sr), ferro (Fe), fluoro (F) e altri componenti ionici minori come il carbonato. Questi elementi possono essere incorporati durante la formazione dei cristalli di apatite, oppure tramite reazioni di scambio etero-ionico (Weatherell, 1975).

L'esigua componente organica dello smalto è principalmente composta da proteine non collageniche, a cui è stato attribuito un importante ruolo di regolazione della mineralizzazione, durante il processo di formazione dello smalto dentale, l'amelogenesi (Arana-Chavez & Massa, 2004).

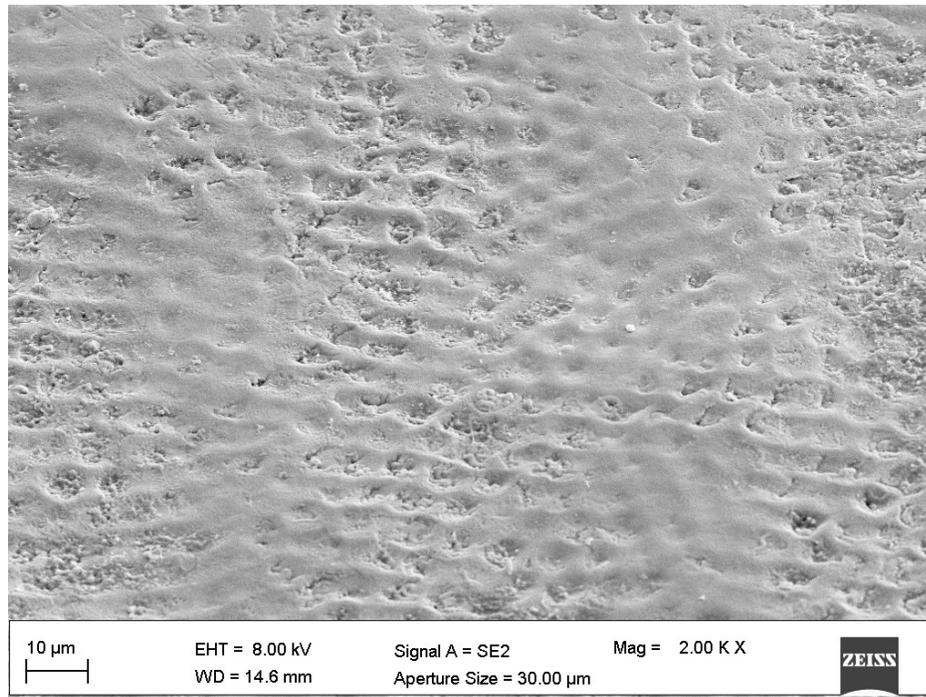


Figura 2. Microstruttura dello smalto osservata al Microscopio a Scansione Elettronica (SEM).

1.2 La dentina

La dentina è un tessuto connettivo mineralizzato di origine mesenchimale, composta per il 70% in peso da una componente inorganica costituita da cristalli di idrossiapatite, per il restante 30% da materiale organico, cellule e matrice extracellulare (ECM) a prevalenza collagenica. Il tessuto dentinale presenta una tipica microstruttura caratterizzata dai ben orientati tubuli dentinali percorsi dai processi odontoblastici. I tubuli si estendono per tutto lo spessore della dentina, dalla polpa alla giunzione amelo-dentinale (Pashley et al., 1995).

La dentina appare come un tessuto omogeneo, duro, di colore bianco-giallognolo. Inoltre, possiede delle caratteristiche fisiche molto importanti, quali l'elasticità, la piroelettricità e la piezoelettricità. Per la minore presenza della componente inorganica è meno mineralizzata dello smalto, ma più dell'osso e del cemento (Goldberg, 2011).

Al suo interno si trova la cavità pulpare occupata dalla polpa dentale con cui costituisce una unità indissolubile in quanto entrambi i tessuti derivano dalla papilla dentale, considerati come un unico complesso funzionale (Orchardson & Cadden, 2001).

Durante l'odontogenesi gli odontoblasti, cellule altamente specializzate di origine mesenchimale, sono fondamentali per la formazione di "dentina primaria" fino a che il dente diventa funzionale. Gli odontoblasti sono cellule specializzate della polpa dentale, localizzati all'interfaccia del complesso polpo-dentinale, dove sono organizzati a palizzata, fornendo una barriera naturale tra i tessuti mineralizzati (smalto e dentina) e la polpa (Bleicher, 2014). Inoltre, sintetizzano e secernono tutti i costituenti dell'ECM (Arana-Chavez & Massa, 2004). L'ECM contiene prevalentemente collagene di tipo I e una varietà di proteine non collageniche.

Le proteine non collageniche svolgono un ruolo fondamentale nella mineralizzazione della dentina in cui sono coinvolte le vescicole di matrice (MVs) all'interno delle quali calcio (Ca^{2+}) e fosfato inorganico si accumulano e iniziano a precipitare per formare i cristalli di idrossiapatite (Bleicher, 2014).

Successivamente, quando si stabiliscono i contatti intercuspidali tra le arcate antagoniste, inizia la formazione di "dentina secondaria" che continua per tutta la vita. L'unica differenza

tra le due è la curva a “S” dei tubuli, che è più accentuata nella dentina secondaria, a causa della graduale restrizione dello spazio degli odontoblasti situati alla periferia della polpa.

Lo strato di dentina più periferica nella regione coronale del dente prende il nome di “dentina mantellare”, spesso dai 15 ai 30 micrometri, principalmente atubulare, costituito da pochi tubuli sottili e ricurvi. È il primo strato ad essere prodotto e mineralizzato, ed ha un contenuto più basso di minerali, consentendo alla dentina di avere proprietà elastiche elevate e quindi di fornire una certa resilienza, che delle forze masticatorie (Wang & Weiner, 1997).

Successivamente viene depositato lo strato più interno, noto come “dentina circumpulpare” che rappresenta la massa principale di tutta la dentina. I tubuli dentinali sono separati gli uni dagli altri dalla “dentina intertubulare”, che si distingue dalla “dentina peritubulare”, meno mineralizzata che circonda il lume dei tubuli (Goldberg, 2011).

Nella dentina intertubulare, due placche parallele formano i cristalliti lamellari, di 2-5 nm di spessore e 60 nm di lunghezza. A basso ingrandimento, i cristalliti intertubulari hanno un aspetto aghiforme e sono spesso situati parallelamente all’asse delle fibrille di collagene; altrimenti, i cristalliti riempiono in modo casuale spazi interfibrillari (Goldberg & Boskey, 1996). Invece la dentina peritubulare è più ricca di minerali ordinati in strutture isodiametriche di circa 25 nm di diametro (Goldberg, 2011).

In presenza di stimoli irritativi lievi o moderati, come la carie, viene prodotta la “dentina terziaria” o “dentina di reazione” che ha una struttura irregolare e viene depositata sulle aree irritate di dentina primaria o secondaria. Mentre la produzione di dentina riparativa è indotta da stimoli più forti per cui avviene la produzione di una nuova generazione di cellule simili ad odontoblasti (Klinge, 2001).

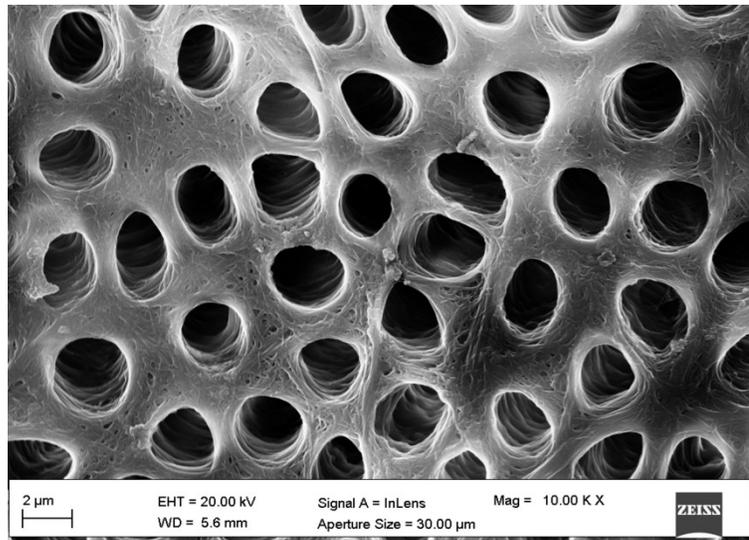


Figura 3. Microstruttura della dentina osservata al Microscopio a Scansione Elettronica (SEM).

1.3 Il cemento

Il cemento è un tessuto mineralizzato che copre la dentina in tutta la superficie radicolare. Il cemento, insieme al legamento parodontale, all'osso alveolare e alla gengiva costituisce il "parodonto", la struttura principale di sostegno dei denti (Yamamoto et al., 2016). Ma, diversamente dagli altri tessuti del parodonto, il cemento non subisce processi di rimodellamento e, fra i tessuti duri, è quello più facilmente soggetto ad usura per abrasione a causa del suo minor grado di calcificazione (Grzesik & Narayanan, 2002).

Il cemento è prodotto da cementoblasti, che depositano la sostanza intercellulare in cui rimangono intrappolati diventando cementociti; ci sono poi i cementoclasti, che possono essere coinvolti nei processi di erosione per traumi o processi flogistici (Saygin et al., 2000). La principale componente organica del tessuto è costituita dalle fibre collagene che possono essere classificate in due tipi: "estrinseche o fibre di Sharpey", che si trovano alle estremità; e le "fibre intrinseche" che sono disposte parallelamente alla superficie del cemento o perpendicolarmente alle fibre estrinseche (Yamamoto et al., 2010).

Le principali proteine non collageniche sono le sialoproteine ossee e l'osteopontina, le quali svolgono ruoli importanti nel processo di mineralizzazione, e successivamente sono implicate nel mantenimento dell'integrità strutturale del cemento (Bosshardt et al., s.d.).

A seconda della presenza di cellule e fibre collagene nell'uomo, si trovano tre tipi di cemento:

- 1) **Il cemento acellulare afibrillare:** composto da matrice mineralizzata, ma priva di fibrille di collagene e cellule. Ricopre l'elemento dentale in corrispondenza della giunzione amelo-cementizia; inoltre, si deposita in chiazze isolate su smalto e dentina. La sua deposizione inizia alla fine della maturazione dello smalto e continua per un tempo indefinito (Bosshardt & Selvig, 1997).
- 2) **Il cemento acellulare fibrillare estrinseco (AEFC):** consiste in una densa banda di fibre collagene impiantate nella matrice dentinale e perpendicolari alla superficie della radice, prodotto dai cementoblasti (Grzesik & Narayanan, 2002).
- 3) **Il cemento cellulare fibrillare intrinseco (CIFC):** contiene cementociti intrappolati nella matrice mineralizzata e le fibre collagene presenti sono parallele alla superficie della radice. Questo tipo di cemento è limitato alle porzioni di radice apicale e alle

biforcazioni e sembra partecipare principalmente alla riparazione di radici che hanno subito un processo di riassorbimento (Schroeder, 1992).

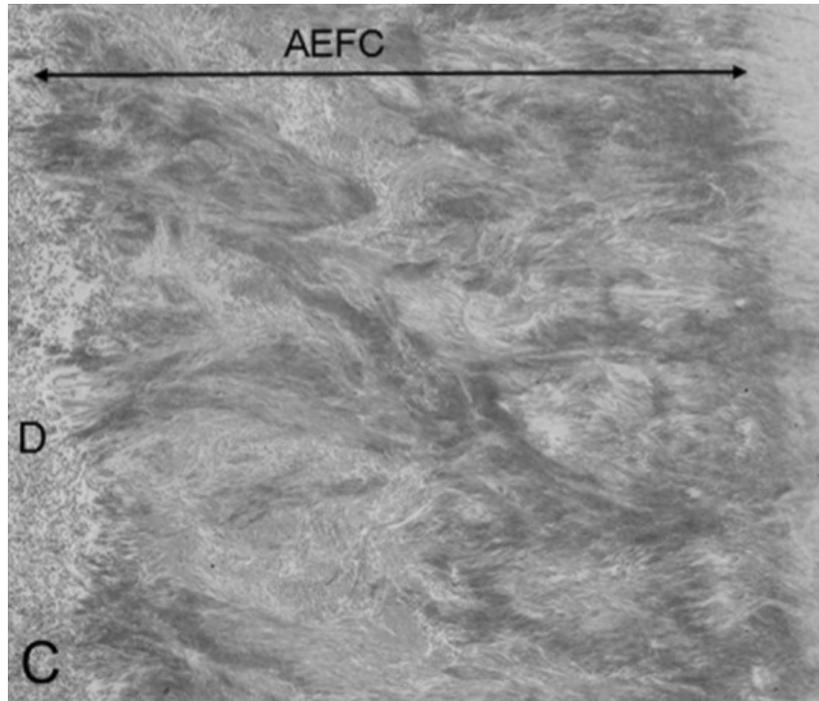


Figura 4. Micrografia a Trasmissione Elettronica (TEM) che mostra il cemento acellulare fibrillare estrinseco (AEFC) (T. Yamamoto et al., 2016).

2 La Demineralizzazione

La demineralizzazione è il processo di perdita degli ioni minerali dai cristalli di idrossiapatite che avviene in tessuti duri come lo smalto, la dentina o il cemento.

A causa della perdita di integrità del reticolo di idrossiapatite vi è una maggiore predisposizione alla produzione di lesioni cavitate che potrebbero evolvere nel tempo in lesioni cariose.

La demineralizzazione è un processo reversibile, in quanto i cristalli di idrossiapatite parzialmente demineralizzati possono crescere fino a raggiungere il loro livello dimensionale originale se esposti ad ambienti orali che favoriscono la loro remineralizzazione (González-Cabezas & Fernández, 2018).

La demineralizzazione e la successiva perdita di superficie del dente sono processi dinamici che possono essere influenzati da diversi fattori: estrinseci, intrinseci o modificanti. I fattori estrinseci includono dieta e farmaci; mentre i fattori intrinseci sono per lo più malattie sistemiche in trattamento farmacologico. Infine, i fattori modificanti come una variazione delle caratteristiche biochimiche di uno degli altri fattori, oppure modelli comportamentali come il regolare spazzolamento dei denti o fattori socioeconomici (Abou Neel et al., 2016).

Fattori biologici	Fattori chimici	Salute e educazione	Fattori comportamentali
Flusso salivare	Tipo di pH	Stato di salute	Abitudini alimentari
Anatomia dei tessuti molli	Tipo acido	Stato socioeconomico	Assunzione di liquidi
Anatomia dentale	Potenziale di chelazione	Alcol e droghe	Frequenza di spazzolamento

Tabella 1. Fattori che possono influenzare la demineralizzazione della superficie del dente.

2.1 Eziologia della demineralizzazione

La demineralizzazione dei tessuti duri del dente può avvenire a causa di diversi fattori: meccanici come spazzolamento e bruxismo, e chimici come acidi intrinseci ed estrinseci (Abou Neel et al., 2016).

2.1.1 Spazzolamento dei denti

L'abrasione da spazzolino da denti è un fattore che fa parte del processo multifattoriale di usura dei denti. È importante tenere in considerazione il tipo di spazzolino utilizzato e il tipo di setole, preferendo quelle morbide; la forza applicata durante il suo utilizzo ed infine l'abrasività del dentifricio (Wiegand et al., 2013), fattore di grande rilevanza se associato all'effetto meccanico delle setole durante lo spazzolamento (Van der Weijden et al., 2011). Risulta di fondamentale importanza la modalità di spazzolamento in quanto l'aumento della forza ha dimostrato una tendenza verso una maggiore usura, che può peggiorare se associata a dentifrici contenenti silice e carbonato di calcio utilizzato. Tra l'altro anche la velocità di spazzolamento incide sulla demineralizzazione dello smalto. Negli ultimi decenni un gran numero di spazzolini elettrici diversi (oscillanti-rotanti, sonici ed ultrasonici) è disponibile sul mercato. Recenti studi suggeriscono che questi hanno un minore potenziale abrasivo in quanto sono utilizzati con forze significativamente inferiori (Van der Weijden et al., 2011).

2.1.2 Bruxismo

Il bruxismo è caratterizzato dal serrare o digrignare i denti a causa della contrazione del massetere, del temporale e di altri muscoli della mascella. Il bruxismo può portare a ipertrofia dei muscoli masticatori, perdita della superficie del dente, frattura di restauri o denti, ipersensibilità o dolore e perdita del supporto parodontale (Beddis et al., 2018).

L'attrito patologico delle superfici occlusali è comunemente associato al bruxismo, tanto più se questo è associato a reflusso gastroesofageo (RGE) (Y. Li et al., 2018).

È molto importante discriminare il bruxismo da sveglia da quello notturno. Il bruxismo da sveglia è segnalato nel 20% tra la popolazione adulta ed è principalmente associato a tic

nervosi e reazioni allo stress. Mentre il bruxismo notturno è riportato nell'8% della popolazione ed è stato classificato come un "movimento correlato al disturbo del sonno" (Lavigne et al., 2008).

2.1.3 Acidi intrinseci

L'erosione intrinseca è il risultato dell'azione di acidi endogeni; ossia l'acidi gastrici che vengono a contatto con i denti durante vomito, rigurgito o reflusso ricorrenti. L'acido gastrico può raggiungere il cavo orale per diversi motivi tra i quali per disturbi di origine psicosomatica, come anoressia o bulimia nervosa, per cui il vomito viene autoindotto (Meurman & Gate, 1996).

L'anoressia consiste in una profonda perdita di peso attraverso il digiuno, vomito autoindotto o abuso di lassativi, dovuta ad una distorsione dell'immagine di sé stesso. Mentre la bulimia nervosa è caratterizzata da grandi abbuffate di cibo, seguite da sensi di colpa e comportamenti anomali. (Westmoreland et al., 2016).

Diversi studi suggeriscono che il 20% dei pazienti affetti da anoressia ed il 90% di quelli affetti da bulimia sono affetti da erosione dentale, con nette differenze. Nei pazienti con anoressia le erosioni sono confinate alla superficie vestibolare del dente, perchè sono causate principalmente da fattori dietetici. Mentre nei pazienti con bulimia sono coinvolte le superfici palatali, in particolare degli incisivi (Gibson et al., 2019).

L'acido gastrico può raggiungere il cavo orale per diverse patologie del tratto gastrointestinale. Tra queste il più diffuso è l'RGE, cioè il reflusso del contenuto gastrico nell'esofago senza conati di vomito, oppure con vomito, che può verificarsi principalmente come risultato di un disturbo funzionale o come conseguenza di vari disordini organici (Chen & Brady, 2019).

Altre cause di origine somatica includono gravidanza e abuso di alcool, a causa dei quali si può avere RGE e vomito (Scheutzel, 1996).

2.1.4 Acidi estrinseci

dell'azione di acidi esogeni. Questi possono essere acidi contaminanti presenti nell'aria dell'ambiente di lavoro, indicati come acidi industriali; oppure acque acide di piscine da

nuoto, oppure un effetto collaterale della clorazione con gas al cloro che reagisce con l'acqua per formare acido cloridrico (Scheutzel, 1996).

Casi gravi di erosione estrinseca sono stati segnalati anche a causa della somministrazione orale di farmaci quali ferro-tonici, sostituti acidi per pazienti affetti da acloridria, o acidi per sciogliere piccoli calcoli renali. L'erosione dentale come effetto collaterale del farmaco è osservata non solo come risultato diretto della frequente assunzione di farmaci acidi trattenuti nei pazienti bocca per un periodo prolungato, ma può anche essere innescato indirettamente dall'assunzione di farmaci che portano al vomito (Hellwig & Lussi, 2014).

Gli acidi alimentari, tuttavia, sono indubbiamente il principale fattore causale dell'erosione estrinseca dei denti. Gli acidi erosivi più consumati sono gli acidi della frutta e l'acido fosforico contenuti nella frutta fresca, nei succhi di frutta e nelle bibite gassate. Più recentemente l'acido ascorbico (vitamina C), contenuto in tutti i tipi di bevande, come bevande sportive e caramelle è stato identificato come una causa significativa di erosione estrinseca (Bahal & Djemal, 2014).

2.2 Manifestazioni cliniche

La demineralizzazione dei tessuti duri del dente, se non viene arrestata, causa delle specifiche manifestazioni, tra le più frequenti troviamo: le white spot lesions; la formazione di cavità cariose e la sensibilità dentinale (Abou Neel et al., 2016).

2.2.1 White Spot Lesions

La decalcificazione dello smalto appare come una lesione o macchia bianca che prende il nome di White Spot Lesions (WSL). La demineralizzazione provoca la perdita del tessuto sottostante ad uno strato superficiale intatto di smalto, così forma una cavità coperta da un sottile strato di tessuto. Le WSL possono apparire come piccole linee o come ampie aree decalcificate con o senza cavitazione (Bergstrand, 2011).

In questo tipo di lesioni la luce viene riflessa in modo differente rispetto allo smalto sano adiacente, dando origine a un aspetto bianco gessoso (Kleter, 1998); infatti le caratteristiche cliniche di queste lesioni includono la perdita della normale traslucenza dello smalto per l'alterazione delle proprietà luminose con aspetto bianco gessoso ed uno strato superficiale fragile suscettibile al danneggiamento (Mount, 2005).

Diversi studi affermano che queste decalcificazioni hanno una frequenza ampiamente variabile dal 2% al 97%. Queste manifestazioni rappresentano la prima osservazione clinica di progressione della carie dentale, con possibilità di reversibilità (Bergstrand, 2011).

Le WSL si sviluppano a causa dell'accumulo prolungato di placca sulla superficie dentale interessata causa di un'igiene orale inadeguata. Con il mantenimento di queste condizioni, gli acidi diffondono nello smalto e iniziano la demineralizzazione dello smalto sotto la superficie. Se il processo di demineralizzazione non viene interrotto, la superficie dello smalto intatta alla fine collassa e provoca la cavitazione (Paula et al., 2017).



Figura 5. Immagine che mostra una white spot lesion. (Paula et., al 2017).

2.2.2 Cavità cariose

Le dinamiche della lesione cariosa dipendono prevalentemente dalla disponibilità di zuccheri fermentabili, condizioni ambientali favorevoli, batteri e predisposizione dell'ospite. Nella carie dentale, vediamo un cambiamento ecologico all'interno dell'ambiente del biofilm dentale, guidato dal frequente accesso di carboidrati alimentari fermentabili. Questo porta ad un passaggio da una popolazione equilibrata di microrganismi a bassa cariogenesi ad uno ad alta cariogenesi e ad una maggiore produzione e correlata tolleranza di acidi organici che promuovono la perdita di minerali nei tessuti duri dentali (Conrads & About, 2018)..

La carie dentale di solito inizia in corrispondenza e al di sotto della superficie dello smalto ad opera dell'acido lattico prodotto dai batteri in seguito alla fermentazione degli zuccheri. Poiché gli acidi si accumulano nella fase fluida del biofilm, il pH scende al punto in cui le condizioni all'interfaccia biofilm-smalto diventano sottosaturi, per questo l'acido demineralizza parzialmente lo strato superficiale del dente. La perdita di minerali porta ad un aumento della porosità, quindi all'allargamento degli spazi tra i cristalli di idrossiapatite e rammollimento della superficie, che permette agli acidi di diffondere più in profondità nel dente con conseguente demineralizzazione del minerale sotto la superficie (Hara & Zero, 2010). Se il processo rimane attivo progredisce ad uno stadio di distruzione più esteso in

quanto la porosità superficiale aumenta con la formazione di microcavitazioni nello smalto (Pitts et al., 2017)

2.2.3 Sensibilità dentale

L'ipersensibilità dentinale (DHS) è uno dei disturbi più comuni che si manifesta nei pazienti odontoiatrici. È stata definita come un dolore breve e acuto che deriva dalla dentina esposta in risposta a stimoli non nocivi, tipicamente termici, evaporativi, tattili, osmotici o chimici (Liu et al., 2020).

La DHS è associata all'esposizione della dentina, in particolare all'esposizione dei tubuli dentinali aperti, e delle terminazioni nervose della polpa dentale in risposta agli stimoli ambientali esterni (Addy et al., 1987).

L'esposizione alla dentina può essere causata da fattori fisici, chimici, patologie biologiche o per sviluppo di anomalie che provocano problemi dentali e/o danni parodontali.

Diverse condizioni cliniche provocano del DHS , in quanto causano un esposizione dei tubuli dentinali nell'ambiente orale includono: l'attrito dello smalto ed erosione, corrosione, abrasione e l'abfrazione (Grippio et al., 2004).

Infatti, l'ipersensibilità dentinale comporta la perdita di tessuto duro che espone la dentina. Sopra la giunzione amelo-cemento, quindi nella corona dentale, la perdita di smalto è un prerequisito necessario per l'esposizione della dentina, e sotto la linea amelo-cementizia, non appena il cemento è esposto, diventa non vitale e si perde lasciando la dentina esposta a livello radicolare (West et al., 2013).

Per esempio, uno spazzolamento aggressivo, può causare la perdita di smalto e l'esposizione della dentina che alla fine può portare allo sviluppo di ipersensibilità dentinale. Inoltre, i cambiamenti nello stile di vita, in particolare la dieta, hanno dimostrato di promuovere la perdita di tessuto duro dentale per erosione. Sia la dentina coronale che radicolare esposta possono essere sensibili, ma nella maggior parte dei casi, questa condizione si verifica preferenzialmente nella regione buccale, cervicale del dente o nell'area radicolare coronale (Addy et al., 1987).

La perdita di dentina e smalto può essere dovuta a qualsiasi combinazione dei processi di usura dei denti, compresa l'erosione, abrasione e attrito. Infine, si può affermare che

l'interazione tra l'erosione e l'abrasione sembrerebbe essere la causa principale dell'usura al margine cervicale e l'apertura di tubuli dentinali (West et al., 2013).

3 La Remineralizzazione

La remineralizzazione è il processo attraverso cui vengono apportati minerali dall'ambiente circostante, i quali vanno a sostituire i minerali di smalto e dentina in strutture parzialmente demineralizzate, oppure creano precipitati minerali amorfi negli spazi intercrystallini (Cochrane et al., 2010).

Durante il processo di remineralizzazione gli ioni calcio e fosfato sono minerali essenziali, infatti la loro limitata biodisponibilità può ostacolare il processo, mentre le terapie mineralizzanti sono state progettate per aumentare direttamente la concentrazione di questi minerali nell'ambiente intorno alle lesioni cariose (nella saliva e nel biofilm) (González-Cabezas & Fernández, 2018).

La remineralizzazione è ottenuta fisiologicamente dagli ioni salivari e può essere potenziata da fattori o elementi esterni come il fluoro, che svolge un ruolo cruciale per migliorare il processo, ma la sua capacità di promuovere la rete di remineralizzazione è limitata dalla disponibilità di calcio e ioni fosfato (Elkassas & Arafa, 2014).

La saliva è considerata il principale fattore biologico nel dettare gli effetti neutralizzanti intraorali dell'esposizione agli acidi, quindi evita che si verifichi l'erosione dei tessuti duri del dente. Infatti quando viene stimolata la secrezione di saliva questa funge come fonte di calcio e ioni fosfato necessari per la remineralizzazione del dente calcificato (Hara & Zero, 2010).

Essa permette che avvenga un processo di riparazione naturale per cui gli ioni calcio e fosfato salivare vengono depositati nei vuoti cristallini della struttura dentale demineralizzata, con conseguente guadagno minerale (Arifa et al., 2019).

Essendo spesso la naturale remineralizzazione non sufficiente; sono stati studiati numerosi tipi di agenti e tecniche remineralizzanti che vengono utilizzati clinicamente, con risultati positivi.

I requisiti di un materiale ideale per la remineralizzazione sono i seguenti (Arifa et al., 2019):

- diffonde o rilascia calcio e fosfato sotto lo strato superficiale del tessuto;
- non fornisce un eccesso di calcio; funziona a pH acido;
- funziona in pazienti xerostomici e aumenta le proprietà remineralizzanti nella saliva.

I trattamenti a base di fluoro sono considerati i principali nella riduzione della demineralizzazione nella maggior parte della popolazione. Tuttavia, attualmente, la terapia con il fluoro ha un'efficacia limitata in alcuni individui. Di conseguenza sono state sviluppate nuove terapie; alcune hanno lo scopo di migliorare l'effetto del fluoro, piuttosto che sostituirlo; mentre quelle che non coinvolgono il fluoro potrebbero diventare un'alternativa (Haugejorden & Magne Birkeland, 2006).

Quindi anche l'applicazione topica di concentrati ricchi di minerali può essere utilizzata per la remineralizzazione delle lesioni cariose. Questi forniscono ioni calcio e fosfato che possono facilmente diffondersi attraverso lo smalto poroso al fine di remineralizzare la lesione dello smalto incipiente (Gao et al., 2016).

3.1 Il fluoro

Il fluoro è il più elettronegativo di tutti gli elementi della tavola periodica e quindi non si incontra mai sulla Terra in questa forma, piuttosto si trova combinato chimicamente sotto forma di fluoruro (F⁻) (O'Mullane, 2016).

Negli elementi dentari alte concentrazioni di fluoro si trovano negli strati esterni dello smalto, ed il contenuto rimane abbastanza costante fino alla giunzione smalto-dentina. La concentrazione esterna dipende dalla diffusione del fluoro nell'ambiente orale, che varia a seconda dell'esposizione a fonti di fluoro ingeribili, agenti terapeutici, saliva e placca dentale (Pessan & Buzalaf, 2011).

Mentre all'interno della dentina la concentrazione di fluoro è generalmente superiore e tende ad aumentare gradualmente dalla giunzione smalto-dentina alla superficie pulpare. Quindi il contenuto di fluoro della dentina è derivato dal percorso sistemico attraverso i vasi della polpa (O'Mullane, 2016).

Il fenomeno di forte affinità tra fluoro ed apatite biologica si basa sulla facilità di sostituzione chimica del componente ossidrilico dell'idrossiapatite con il fluoro, questo fenomeno porta alla formazione della fluoroapatite. Una volta formata, la fluoroapatite, rimane chimicamente stabile (Pessan & Buzalaf, 2011).

La fluoroapatite presenta due principali vantaggi: in primo luogo il fluoro agisce da catalizzatore, coadiuvando la remineralizzazione dello smalto con ioni fosfato disciolti nella saliva; questo può aiutare a contrastare qualsiasi demineralizzazione avvenuta (Rios et al., 2008).

In secondo luogo, la sostituzione del gruppo ossidrilico con il fluoro, conferisce una maggiore resistenza dei tessuti duri del dente all'acido lattico prodotto dalla fermentazione batterica del saccarosio (Jensdottir et al., 2005).

Per questo il trattamento al fluoro è ancora la terapia standard per la remineralizzazione delle lesioni cariose. Infatti diverse terapie al fluoro hanno dimostrato di essere clinicamente efficaci nell'arresto delle lesioni cariose, come l'utilizzo di dentifrici a 5000ppm di fluoro oppure vernici ad alte concentrazioni applicate professionalmente (Wierichs & Meyer-Lueckel, 2015).

Il dentifricio al fluoro è ora il metodo più utilizzato per mantenere un basso livello costante di fluoro nell'ambiente orale (Goldman et al., 2008).

I fluoruri topici possono essere suddivisi in due grandi categorie: quelli applicati professionalmente come la vernice, il gel, la schiuma. Oppure gli autoapplicati come il dentifricio ed il collutorio. Ad eccezione del dentifricio al fluoro, i fluoruri topici sono generalmente raccomandati per individui considerati a rischio di carie moderato o elevato, dopo aver preso in considerazione altre esposizioni sistemiche al fluoro attraverso cibo ed acqua (O'Mullane, 2016).

Quindi, per l'uso quotidiano, in commercio si trovano dentifrici contenenti vari composti fluorati, quali il fluoruro di sodio, fluoruro stannoso, monofluorofosfato di sodio e fluoruro di ammina (Lippert, 2013).

È ormai generalmente accettato che la concentrazione di fluoro "standard" nel dentifricio sia compreso tra 1000ppm e 1500ppm. Mentre dentifrici a più alto contenuto di fluoro sono disponibili su prescrizione per adulti con alto rischio di carie (Wierichs & Meyer-Lueckel, 2015).

Inoltre possono essere utilizzati i fluoruri topici diversi dal dentifricio, come vernici o gel, che sono definiti sistemi di somministrazione che forniscono fluoro alle superfici esposte della dentatura permanente e decidua a concentrazioni elevate per un effetto protettivo locale (Marinho et al., 2003).

3.2 Fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP)

La caseina è la fosfoproteina predominante nel latte bovino e rappresenta circa l'80% delle sue proteine totali, principalmente come complessi micellari stabilizzati con fosfato di calcio. Il fosfopeptide di caseina (CPP), che contiene la sequenza amminoacidica di cluster di -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu dalla caseina, è insapore, ha una bassa antigenicità e può essere purificato come nanocomplessi di fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP) mediante precipitazione selettiva, scambio ionico o ultrafiltrazione (J. Li et al., 2014).

L'influenza del latte e dei prodotti lattiero-caseari sulla carie è nota. Infatti le ultime indagini sul ruolo della caseina e dei concentrati di fosfato di calcio derivanti dal latte sulla remineralizzazione hanno concluso che: i complessi di fosfopeptide di caseina (CPP) stabilizza il fosfato di calcio e permette la remineralizzazione delle lesioni cariose incipienti (Üstün & Aktören, 2019).

Inoltre, è stato dimostrato che gli agenti remineralizzanti contenenti fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP) permettono la remineralizzazione della carie iniziale degli strati più profondi dello smalto fungendo da serbatoio di ione calcio e ione fosfato. Questi promuovono la formazione di idrossiapatite, agendo come tampone al pH acido, e aumentano il pH orale, aumentando perciò la solubilità dei sali di calcio (Cai et al., 2009).

La fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP), il calcio e gli ioni fosfato che contiene possono essere stabilizzati sulla superficie dello smalto demineralizzato per un periodo di tempo più lungo se sono combinati con ioni fluoruro da altre fonti esterne. Inoltre, la combinazione di caseina fosfopeptide-fosfato di fluoruro di calcio amorfo (CPP-ACFP) è stato segnalato per contribuire alla procedura di remineralizzazione e per avere un'efficacia superiore rispetto alla fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP) (Üstün & Aktören, 2019).

Il complesso fosfato di fluoruro di calcio amorfo (ACPF) fornisce tutti gli elementi necessari per promuovere la remineralizzazione con la formazione di fluoroapatite, la quale risulta più resistente agli acidi (J. Li et al., 2014).

In seguito a diversi studi è possibile affermare che la fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo (CCP-ACP) ha effetto remineralizzante a breve termine; mentre gli effetti a lungo termine sono limitati, ma ancora la letteratura a riguardo non è abbastanza ampia (Zero, 2009).

3.3 Nano-idrossiapatite

L'idrossiapatite è un composto di fosfato di calcio con formula molecolare $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ e un rapporto calcio-fosforo di 1:67. Essa è stabile e poco solubile, però gli svantaggi di questo materiale derivano dalla sua struttura porosa e scarse proprietà meccaniche.

Alla luce di questo, è stata sintetizzata la nano-idrossiapatite (nano-HA) che presenta cristalli di dimensioni comprese tra 50 e 1000nm (Pepla, 2014). La sua sintesi è impegnativa dal punto di vista tecnico e richiede vari metodi come: sintesi sol-gel; reazione allo stato solido; co-precipitazione e precipitazione chimica umida reazione idrotermale (Bordea et al., 2020). Utilizzando precipitanti come citrati, amminoacidi acidi o EDTA (acido etilendiamminotetraacetico), la mediazione e il controllo della nucleazione, la crescita e la stabilità dei cristalli possono essere raggiunti. Inoltre, si possono ottenere nano-fibre di nano-HA attraverso l'elettrofilatura (Bordea et al., 2020).

Tra i tanti settori in cui la nano-HA è impegnata troviamo la prevenzione della carie, dove viene utilizzata per la remineralizzazione dello smalto e della dentina colpiti dall'attacco carioso. Infatti essa agisce sia come sostituzione diretta degli ultimi minerali rimasti, che come vettore per gli ioni persi a causa della demineralizzazione cariosa (Besinis et al., 2014). Per la prevenzione della carie, la nano-HA è incorporata nei dentifrici in modo da fornire gli ioni necessari a ridurre la demineralizzazione e migliorare la remineralizzazione. Così le nanoparticelle possono penetrare nelle porosità dei denti e può produrre uno strato protettivo sul dente (Souza et al., 2015).

La nano-HA, quando è contenuta nei dentifrici, ha una forte capacità di legarsi con le proteine oltre, che con i frammenti di placca e batteri. Questa capacità è dovuta alle dimensioni delle nanoparticelle che aumentano notevolmente la superficie a cui le proteine possono legarsi (Pepla, 2014).

Si può affermare infine che la funzione biomimetica dell'idrossiapatite è quella di proteggere i denti attraverso la creazione di un nuovo strato di smalto sintetico intorno al dente, piuttosto che indurire lo strato esistente con fluoro, che si trasforma chimicamente in alofosfato di calcio $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}]$ (Pepla, 2014).

Di fondamentale importanza in Odontoiatria, è l'aggiunta di piccole percentuali di nano-HA

(0,25%) nelle bevande, come gli integratori minerali per l'attività sportiva, al fine di prevenire l'erosione dei denti causata da tali bevande (Besinis et al., 2014).

È stato studiato anche l'uso della nano-HA come materiale che potrebbe migliorare le proprietà dei materiali attualmente utilizzati nell'odontoiatria restaurativa. Si sono concentrati sull'aggiunta di acidi contenenti N-vinilpirrolidone, nano-HA e fluoroapatite ai cementi vetroionomerici convenzionali. In questo modo i cementi hanno proprietà uniche come la biocompatibilità, l'azione anticariogena (dovuta al rilascio di fluoruri) e l'adesione a molte strutture dentali (Moshaverinia et al., 2008).

4 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

In odontoiatria, il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) viene utilizzato per eseguire un'analisi qualitativa della morfologia di superficie di tessuti e materiali dentali. A differenza del microscopio ottico, che si basa su un fascio di luce per la visualizzazione dell'oggetto, il SEM sfrutta un fascio di elettroni che attraversa l'oggetto. La risoluzione di uno strumento di imaging dipende principalmente dalla lunghezza d'onda della particella utilizzata come sonda. Grazie alla lunghezza d'onda degli elettroni, di molto inferiore rispetto a quella dei fotoni, il potere di risoluzione del SEM è nettamente superiore rispetto a quella del microscopio ottico, di circa 1000 volte. Inoltre, anche la profondità di campo del SEM è molto più elevata, consentendo immagini ottimali anche per campioni con spessore elevato. La sorgente di elettroni di un SEM può essere un filamento di tungsteno, oppure nei microscopi più sensibili e performanti un filamento di esaboruro di lantanio o di cerio. Il campione viene mantenuto sottovuoto per evitare che l'aria disturbi la creazione del fascio di elettroni. Il campione deve essere conduttivo, altrimenti produrrebbe cariche elettrostatiche che disturberebbero la rilevazione del segnale. Nel caso di campioni non conduttivi, essi possono essere ricoperti da particelle metalliche con degli strumenti specifici. Nel SEM, il campione viene sottoposto ad una scansione riga per riga con il fascio di elettroni su un'area specifica. Il fascio elettronico viene quindi scansionato e trasformato in segnale televisivo; il risultato è quello di una immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo (Kaufmann, 2003).

Le immagini ottenute al SEM mostrano una scala di grigi in corrispondenza alla tipologia del materiale analizzato: infatti, la penetrazione del fascio di elettroni varia in funzione al numero atomico dell'elemento, o meglio, è maggiore in materiali più leggeri (immagini più scure) e minore in materiali più pesanti (immagini più chiare).

In questo studio, il SEM viene utilizzato per analizzare con immagini ad alta risoluzione la morfologia di superficie dello smalto trattato con diversi agenti remineralizzanti.

Protocollo sperimentale

5 Obiettivo

Lo scopo del presente studio *in vitro* è quello di valutare qualitativamente l'effetto di diversi agenti remineralizzanti in commercio sul pattern dello smalto dopo sei, dodici, diciotto e ventiquattro giorni di trattamento mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM).

6 Materiali e metodi

6.1 Preparazione del campione

Ventiquattro terzi molari sani sono stati estratti per ragioni parodontali o ortodontiche e sono stati inclusi nello studio secondo i seguenti criteri: corona intatta, priva di carie, crepe, restauri o ipoplasia. I depositi di tartaro e tessuto molle sono stati rimossi mediante scaling a ultrasuoni con acqua distillata. Tutti i campioni sono stati conservati prima del trattamento in una soluzione di clorammina allo 0,5% (w/w) (NH₂Cl).

Successivamente i campioni sono stati assegnati in modo casuale ai seguenti sei gruppi (n=4):

1. Gruppo Controllo (**CTR**), senza trattamento;
2. Gruppo Negativo (**GN**), trattato con soluzione demineralizzante di acido lattico 0,1M regolato a pH 4.4;
3. Gruppo Mousse (**GM**), trattato con GC Tooth mousse (Recaldent, GC Europe), mousse di fosfopeptide di caseina (CPP) e fosfato di calcio amorfo (ACP) associati a monofluoruro fosfato di sodio allo 0,33%;
4. Gruppo Nano-idrossiapatite (**GN-HA**), trattato con Biorepair plus trattamento d'urto ripara smalto contenente nano-HA (Biorepair, Europe), con 280 mg/g di microRepair;
5. Gruppo Duraphat (**GD**), trattato con Duraphat (Colgate-Palmolive, United States), vernice al fluoruro di sodio al 5%;
6. Gruppo Biosmalto (**GB**), trattato con Biosmalto (Curasept S.p.A., Italia), una mousse contenente fosfato di calcio amorfo fluorizzato con fluoro e carbonato ricoperto da citrato.

Per creare una lesione artificiale simile alla carie incipiente sulla superficie dello smalto, tutti i campioni sono stati immersi in una soluzione demineralizzante (acido lattico 0,1M regolato a pH 4.4) per 72h a temperatura ambiente.

Dopo la formazione della lesione artificiale, i campioni sono stati accuratamente risciacquati e asciugati.

Dunque, è stato utilizzato un ciclo del pH (demineralizzazione-remineralizzazione) che mirava a simulare modelli di fluttuazione del pH orale. Ogni giorno i campioni test hanno eseguito un ciclo di demineralizzazione con acido lattico 0,1 M per 6h.

Dopo il periodo di demineralizzazione, sono stati applicati gli agenti remineralizzanti testati secondo le istruzioni del produttore con microbrush di misura regolare (2.0mm).

Tra i cicli di demineralizzazione e remineralizzazione i campioni sono stati conservati in saliva artificiale (Biotène Oral balance, Laclede, Inc. Rancho Dominguez, CA, USA) composta da: acqua depurata, amido idrogenato idrolizzato, xilitolo, idrossietilcellulosa, polimetacrilato, beta-d-glucosio, lattoperossidasi (12,000 unità), lisozima (12mg), lattoferrina (12mg), glucosio ossidasi (12,000 unità), tiocianato di potassio, aloe vera.

I campioni sono stati risciacquati con acqua deionizzata per cinque secondi tra un passaggio e l'altro, per rimuovere la soluzione demineralizzante o l'agente in eccesso dopo ogni passaggio. Questo ciclo è stato ripetuto per 28 giorni.

6.2 Analisi SEM-EDS

Al fine di osservare i cambiamenti della superficie dello smalto nel processo di remineralizzazione è stato utilizzato un microscopio elettronico TESCAN VEGA 3 LMU (Dipartimento SIMAU, Facoltà di Ingegneria, UNIVPM). I campioni sono stati osservati al SEM a 28 giorni di trattamento con agente remineralizzante a diversi ingrandimenti: 200x, 500x, e 1000x.

La caratterizzazione chimica della superficie è stata effettuata con spettroscopia EDS (Energy Dispersive X-ray Spectrometry) mediante microanalisi EDAX Element (AMETEK GmbH, EDAX Business Unit, Weiterstadt, Germania). I parametri operativi EDS erano: distanza di lavoro di 15 mm, tensione di accelerazione di 25 kV con ingrandimento 1000x. Sono state valutate le concentrazioni in peso (%) dei vari elementi chimici.



Figura 6. Immagine che mostra il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) e il montaggio dei campioni.

6.3 Analisi Statistica

I dati ottenuti dall'analisi chimica spettroscopica sono stati salvati ed elaborati. I risultati ottenuti degli elementi Calcio (Ca) e Fosforo (P) sono stati utilizzati per ottenere il rapporto Ca/P, presentati poi come media e deviazione standard (SD). Le differenze significative tra i gruppi sperimentali sono state determinate mediante analisi della varianza one-way ANOVA, seguita dal Tukey test, utilizzando il software statistico Prism8 (GraphPad Software, Inc.). La dimensione del gruppo è stata fissata a N=6 per tutti i gruppi sperimentali; la significatività è stata fissata $p < 0,05$.

7 Risultati

Le micrografie a scansione elettronica, prese a tre diversi ingrandimenti per ogni gruppo, mostrano morfologie distinte della superficie dello smalto.

I risultati qualitativi del gruppo CTR presentano l'aspetto tipico della morfologia dello smalto sano (figura 9). A minor ingrandimento si evince la presenza dei perykimata (ondulazioni superficiali dello smalto, frecce nere); mentre a maggior ingrandimento si nota la struttura cristallina composta dai prismi dello smalto e la zona interprismatica intatta (freccia bianca).

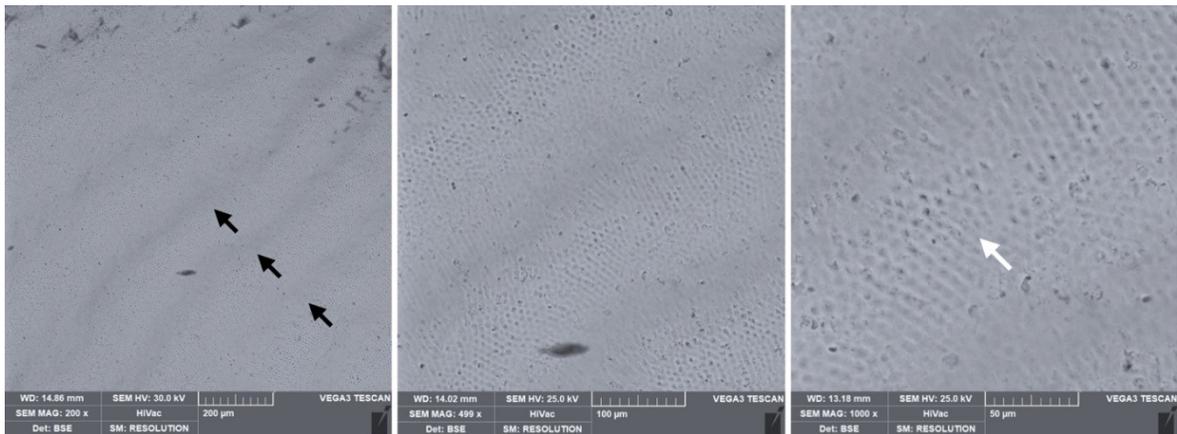


Figura 7. Micrografie elettroniche a scansione del gruppo CTR, a 200x, 500x e 1000x di ingrandimento (rispettivamente da destra a sinistra).

Le micrografie del gruppo GN, invece, mostrano una morfologia dello smalto demineralizzato (figura 10). A minor ingrandimento si apprezza una superficie irregolare, con la presenza di crepe e di uno stadio precoce della distruzione della sostanza interprismatica (frecce bianche); mentre a maggior ingrandimento si nota la struttura a “nido d’ape” (honeycomb structure), caratterizzato dalla dissoluzione selettiva dei cristalli di apatite all’interno del prisma.

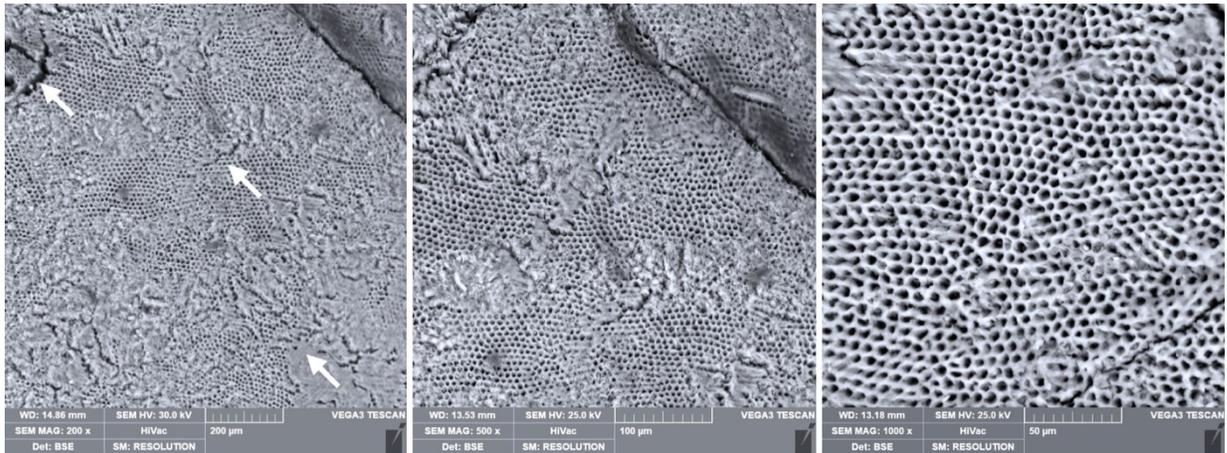


Figura 8. Micrografie elettroniche a scansione del gruppo GN, a 200x, 500x e 1000x di ingrandimento (rispettivamente da destra a sinistra).

La figura 9 presenta i risultati qualitativi del gruppo GM. Le immagini a minor ingrandimento mostrano una morfologia della superficie dello smalto intatta, con un parziale recupero dei cristalli dei prismi, sebbene a maggior ingrandimento si evince ancora la presenza di una leggera dissoluzione interprismatica (freccia bianca). Inoltre, sono evidenti dei residui organici del materiale sulla superficie (freccia nera).

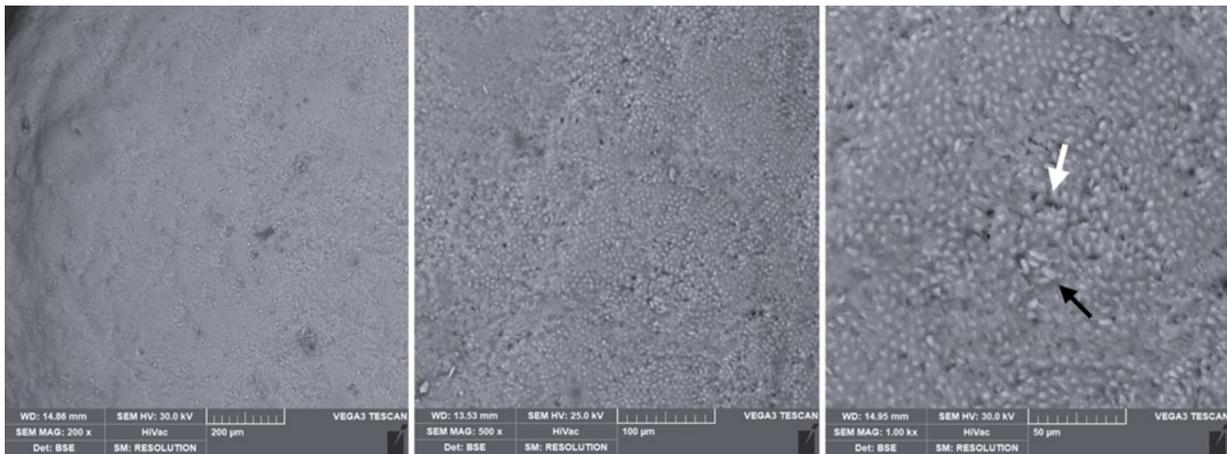


Figura 9. Micrografie elettroniche a scansione del gruppo GM, a 200x, 500x e 1000x di ingrandimento (rispettivamente da destra a sinistra).

Le micrografie rappresentative del gruppo GN-HA mostrano una superficie non completamente regolare (Figura 10), a minor ingrandimento si evidenziano zone interprismatiche intatte (asterisco nero) alternate da crepe dello smalto (freccie nere). A

maggior ingrandimento si evince la presenza dei prismi dello smalto con cristalli parzialmente intatti con leggera dissoluzione dell'area interprismatica (freccia bianca).

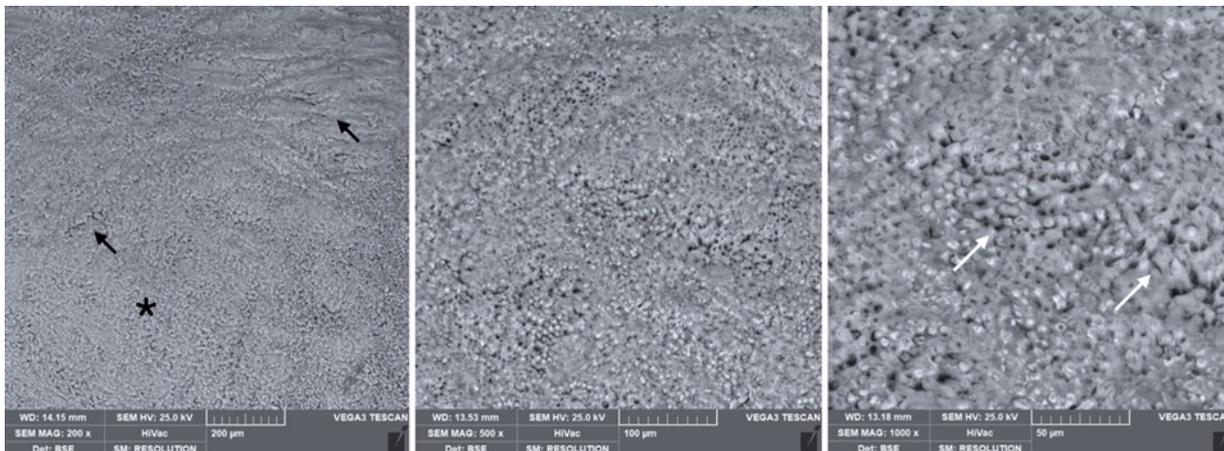


Figura 10. Micrografie elettroniche a scansione del gruppo GN-HA, a 200x, 500x e 1000x di ingrandimento (rispettivamente da destra a sinistra).

La figura 11 mostra i risultati qualitativi del gruppo GD. Le micrografie presentano una superficie irregolare senza evidente distruzione della struttura interprismatica. A minor ingrandimento si alternano zone interprismatiche intatte (asterisco nero) con aree irregolari sulla superficie delle smalto (freccie nere). Invece, a maggior ingrandimento si evince la presenza dei prismi dello smalto con cristalli parzialmente intatti ed una struttura dell'area interprismatica quasi ristabilita.

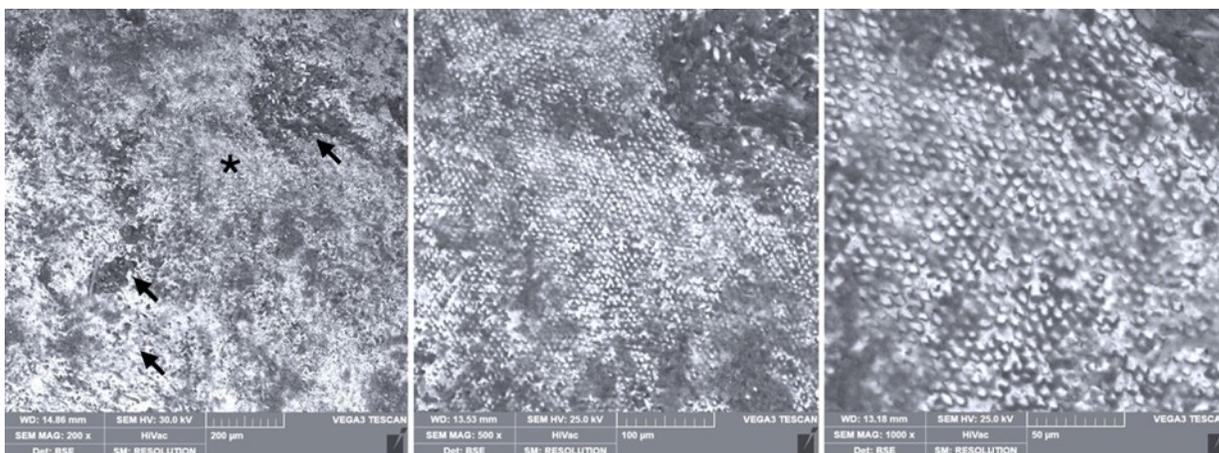


Figura 11. Micrografie elettroniche a scansione del gruppo GD, a 200x, 500x e 1000x di ingrandimento (rispettivamente da destra a sinistra).

Infine, la figura 12 presenta i risultati qualitativi del gruppo GB. Dalle immagini a minor ingrandimento si evince una struttura apparentemente intatta dello smalto, con la presenza di residui di materiale sulla superficie (freccia nera). A maggior ingrandimento si apprezza una superficie irregolare con una leggera dissoluzione interprismatica (asterisco nero). Inoltre, sono evidenti i prismi dello smalto parzialmente integri (freccia bianca).

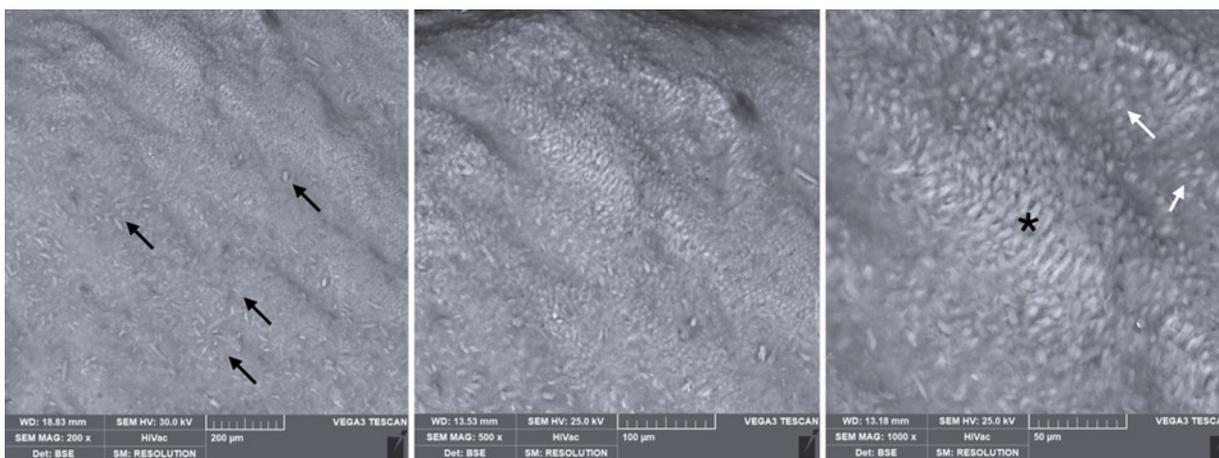


Figura 12. Micrografie elettroniche a scansione del gruppo GB, a 200x, 500x e 1000x di ingrandimento (rispettivamente da destra a sinistra).

I risultati dell'analisi chimica spettroscopica di superficie di ciascun gruppo sono stati descritti nella Tabella 2, e rappresentato graficamente con l'analisi statistica del rapporto Ca/P

nella figura 15. L'analisi statistica mostra come il rapporto Ca/P del gruppo GN sia statisticamente diverso da tutti gli altri gruppi, mentre non ci sono differenze tra il gruppo CTR e tutti i gruppi test. Inoltre, il gruppo GB ha mostrato differenze statisticamente significative con il gruppo GN-HA e GD.

	CTR	GN	GM	GN-HA	GD	GB
Media	2.09	2.43	2.10	2.14	2.12	2.00
DS	0.05	0.08	0.28	0.05	0.09	0.03

Tabella 2. Media e Deviazione Standard (DS) dei risultati EDS ottenuti dal rapporto Ca/P dei gruppi GCTR (Gruppo Controllo), GN (Gruppo Negativo), GM (Gruppo Mousse), GN-HA (Gruppo Nanoidrossiapatite), GD (Gruppo Duraphat), GB (Gruppo Biosmalto).

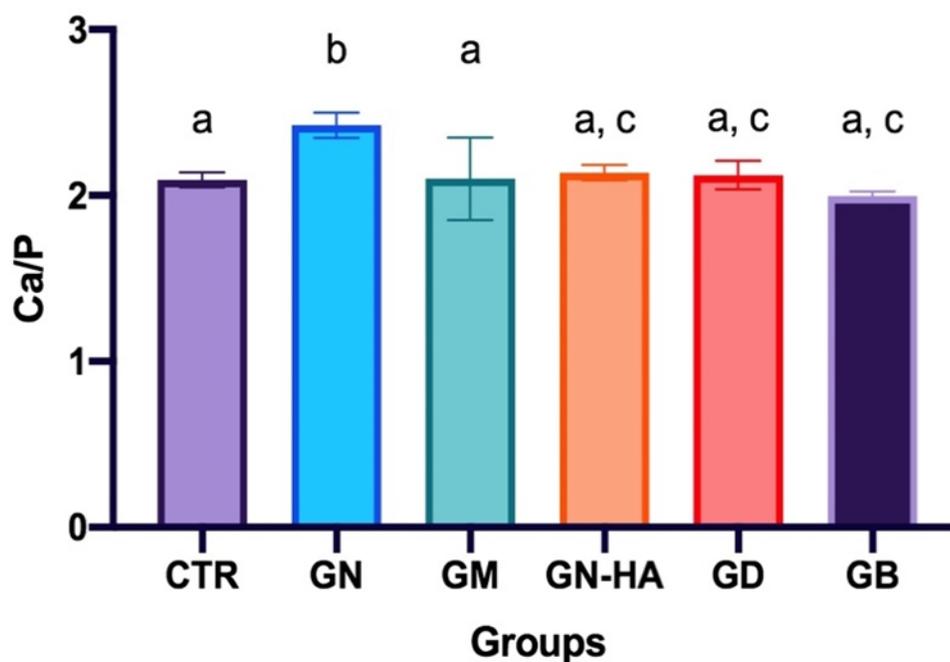


Figura 13. Le diverse lettere (a,b,c) indicano la significatività statistica. One-way ANOVA e Test di confronto multiplo di Tukey, $p < 0,05$.

8 Discussione

L'era dell'odontoiatria preventiva e minimamente invasiva impone chiaramente la necessità di sviluppare nuovi approcci per remineralizzare le lesioni della carie dello smalto. La comprensione dello squilibrio tra remineralizzazione ed il processo di demineralizzazione dello smalto è il fattore chiave per il controllo e la prevenzione della carie (Zhang et al., 2014). Diversi studi confermano che è ottenibile un'efficace gestione delle lesioni cariose attraverso la rilevazione precoce della demineralizzazione iniziale ed utilizzando delle tecniche non invasive attraverso dei mezzi contenenti degli agenti remineralizzanti (Aoba, 2004).

Molti prodotti oggi presenti nel mercato, contenenti calcio, fosfato e fluoruro nelle loro forme biodisponibili, hanno dimostrato la potenzialità di aumentare il processo di remineralizzazione della superficie dentale.

L'obiettivo di questo studio *in vitro* è di valutare qualitativamente e quantitativamente l'effetto di remineralizzazione di quattro diversi agenti sulla superficie dello smalto dopo l'esposizione all'ambiente acido.

Diversi studi hanno sviluppato differenti metodi di demineralizzazione che utilizzano il ciclo del pH e modelli acidati, per ottenere una lesione artificiale dello smalto (Bijle et al., 2021; Giulio et al., 2009).

. In questo studio, per creare la lesione iniziale dello smalto, in accordo con Yavuz e Kargul, i campioni sono stati immersi per 72h in soluzione demineralizzante contenente 0,1M di acido lattico a pH 4,4 (Yavuz & Kargul, 2021). Bonetti et al., mostra che un'esposizione inferiore, può ridurre gli effetti demineralizzanti che si verificano sulla superficie dello smalto, simulando così la fase iniziale di una lesione cariosa (Bonetti & Clarkson, 2016; Giulio et al., 2009).

Le micrografie SEM di GN dimostrano un modello iniziale di demineralizzazione con evidente dissoluzione di tessuto interprismatico. In particolare, la superficie dello smalto demineralizzato mostra una perdita del nucleo del prisma dello smalto, portando a una disposizione disordinata della struttura residua. Inoltre, il rapporto quantitativo Ca/P (Calcio/Fosforo) in GN è pari a $2,43 \pm 0,08$, molto più alto rispetto a CTR $2,09 \pm 0,05$, che non

ha subito demineralizzazione. Ciò evidenzia come in seguito alla perdita di minerali per demineralizzazione, vi è una maggiore concentrazione di P rispetto a quella di Ca, quindi il rapporto tra i due aumenta (Aoba, 2004).

Dai risultati qualitativi SEM si evince che, dopo 28 giorni, nei gruppi GM, GN-HA, GB e GD la struttura dello smalto presenta similitudini con quella di uno smalto sano ed intatto, come mostrato dalle micrografie del gruppo CTR. Tuttavia, tra i gruppi testati, GM e GN-HA rappresentano quelli che hanno dimostrato essere veri protagonisti di una quasi completa remineralizzazione dello smalto. Infatti, a maggior ingrandimento si nota come la struttura interprismatica sia intatta con la presenza del nucleo del prisma dello smalto (figura 11 e 12). Inoltre, per quanto riguarda l'analisi chimica di superficie, i rapporti Ca/P si sono sempre più avvicinati al valore di CTR che non ha subito demineralizzazione. Ma vi sono differenze tra gli effetti esercitati dei quattro prodotti.

Questo suggerisce un ottimo potenziale remineralizzante della GC Tooth Mousse (GM), in accordo con lo studio di Yu et al. in cui, in seguito all'esposizione ad un acido, le applicazioni topiche giornaliere di CCP-ACP hanno dimostrato un'efficacia nell'aumentare la remineralizzazione dello smalto (Yu et al., 2018). Inoltre, il complesso CCP-ACP in associazione con il fluoro (CCP-ACPF) ha mostrato un miglioramento della remineralizzazione (Singhal & Rai, 2017). Pertanto, i risultati di questo studio confermano i potenziali benefici di CCP-ACPF, come evidenziato dalla letteratura (Carrouel et al., 2020; Sinfiteli & Coutinho, s.d.)

Dopo 28 giorni di applicazione nel gruppo GM, si riscontra un ottimo potenziale di remineralizzazione, in quanto il rapporto Ca/P si è abbassato al di sotto del valore di CTR. Molti studi hanno dimostrato che gli ioni citrato svolgono un ruolo importante nella stabilizzazione del fosfato di calcio amorfo (Ivanchenko et al., 2017). Inoltre, è stato dimostrato che l'uso di fluoruro e citrato modifica le specifiche proprietà fisico-chimiche di ACP, per generare un maggiore potenziale anticariogeno ed effetti remineralizzanti (Iafisco et al., 2018).

Al contrario di ciò che viene sostenuto da altri articoli (Iafisco et al., 2018), da questo studio si evince che la remineralizzazione, in seguito ad applicazione di fosfato di calcio amorfo

fluorizzato con fluoro e carbonato ricoperto da citrato, non avviene rapidamente, piuttosto richiede almeno 28 giorni di applicazione topica.

Il gruppo GD, trattato con una vernice Duraphat a base di fluoruro di sodio al 5% solo dopo 28 giorni di trattamento ha mostrato una lieve remineralizzazione, ma il rapporto tra Ca/P rimane comunque maggiore rispetto a CTR. In accordo con diversi studi, la vernice a base di fluoro al 5% è meno efficace rispetto agli altri prodotti remineralizzanti (Molaasadolah, 2017; Orsini, 2020),

In disaccordo con questi e con i nostri risultati, alcuni studi affermano che la vernice al fluoro di sodio al 5% rappresenta il massimo agente efficace per la remineralizzazione (Fernández-Ferrer et al., 2018; Godoi et al., 2019),.

Infine, il gruppo GN-HA, trattato con nano-HA, ha dato ottimi risultati a 7 giorni, infatti il rapporto Ca/P risultava minore di CTR, in accordo con altri studi (Poggio et al., 2010; Scribante et al., 2020),.

In questo studio, dopo 28 giorni di trattamento, tutti i gruppi mostrano un rapporto Ca/P maggiore rispetto a GN (gruppo negativo) demineralizzato; perciò, tutti i prodotti testati hanno avuto un effetto remineralizzante.

Attraverso le micrografie SEM e l'analisi chimica EDS è stato possibile valutare i cambiamenti del tessuto duro dello smalto sia qualitativamente, che quantitativamente. Studi futuri sono comunque necessari per confermare i risultati ottenuti con test di micro-durezza e sarebbe interessante valutare l'effetto di tali prodotti in vivo.

9 Conclusione

In conclusione, in seguito ad esposizione ad ambiente acido, le applicazioni topiche di CCP-ACP associato allo 0,33% di monofluorurofosfato di sodio, testate in GM, hanno dato risultati migliori. Inoltre, il gruppo GB, trattato con fosfato di calcio amorfo addizionato con fluoro e carbonato ricoperto da citrato, mostra un rapporto Ca/P minore del gruppo controllo. Ciononostante, dopo 28 giorni di trattamento, tutti i prodotti presentano una buona capacità remineralizzante sullo smalto demineralizzato, presentando un rapporto Ca/P non statisticamente diverso al gruppo CTR. Nonostante ciò, non è stata ottenuta una completa remineralizzazione, piuttosto una riorganizzazione della struttura dello smalto. Infatti, all'analisi quantitativa (EDS) sono stati ottenuti buoni risultati per quanto riguarda il rapporto Ca/P, ma all'analisi qualitativa (SEM) ancora non si ha una struttura remineralizzata completa.

10 Bibliografia

- Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine, Volume 11*, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Addy, M., Mostafa, P., & Newcombe, R. G. (1987). Dentine hypersensitivity: The distribution of recession, sensitivity and plaque. *Journal of Dentistry, 15*(6), 242–248. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(87\)90045-5](https://doi.org/10.1016/0300-5712(87)90045-5)
- Aoba, T. (2004). Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Diseases, 10*(5), 249–257. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01030.x>
- Arana-Chavez, V. E., & Massa, L. F. (2004). Odontoblasts: The cells forming and maintaining dentine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36*(8), 1367–1373. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.006>
- Arifa, M. K., Ephraim, R., & Rajamani, T. (2019). Recent Advances in Dental Hard Tissue Remineralization: A Review of Literature. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 12*(2), 139–144. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1603>
- Bahal, P., & Djemal, S. (2014). Dental Erosion from an Excess of Vitamin C. *Case Reports in Dentistry, 2014*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/485387>
- Beddis, H., Pemberton, M., & Davies, S. (2018). Sleep bruxism: An overview for clinicians. *British Dental Journal, 225*(6), 497–501. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.757>

- Bergstrand, F. (2011). A Review on Prevention and Treatment of Post-Orthodontic White Spot Lesions—Evidence-Based Methods and Emerging Technologies. *The Open Dentistry Journal*, 5(1), 158–162. <https://doi.org/10.2174/1874210601105010158>
- Besinis, A., van Noort, R., & Martin, N. (2014). Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dental Materials*, 30(3), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.11.014>
- Bijle, M. N., Abdalla, M. M., Ashraf, U., Ekambaram, M., & Yiu, C. K. Y. (2021). Enamel remineralization potential of arginine-fluoride varnish in a multi-species bacterial pH-cycling model. *Journal of Dentistry*, 104, 103528. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103528>
- Bleicher, F. (2014). Odontoblast physiology. *Experimental Cell Research*, 325(2), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.012>
- Bonetti, D., & Clarkson, J. E. (2016). Fluoride Varnish for Caries Prevention: Efficacy and Implementation. *Caries Research*, 50(Suppl. 1), 45–49. <https://doi.org/10.1159/000444268>
- Bordea, I. R., Candrea, S., Alexescu, G. T., Bran, S., Băciuț, M., Băciuț, G., Lucaciu, O., Dinu, C. M., & Todea, D. A. (2020). Nano-hydroxyapatite use in dentistry: A systematic review. *Drug Metabolism Reviews*, 52(2), 319–332. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1758713>
- Bosshardt, D. D., & Selvig, K. A. (1997). Dental cementum: The dynamic tissue covering of the root. *Periodontology 2000*, 13(1), 41–75. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00095.x>

- Bosshardt, D. D., Zalzal, S., Mckee, M. D., & Nanci, A. (s.d.). *Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum*. 21.
- Cai, F., Shen, P., Walker, G. D., Reynolds, C., Yuan, Y., & Reynolds, E. C. (2009). Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium. *Journal of Dentistry*, 37(10), 763–768.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.06.003>
- Carrouel, F., Viennot, S., Ottolenghi, L., Gaillard, C., & Bourgeois, D. (2020). Nanoparticles as Anti-Microbial, Anti-Inflammatory, and Remineralizing Agents in Oral Care Cosmetics: A Review of the Current Situation. *Nanomaterials*, 10(1), 140. <https://doi.org/10.3390/nano10010140>
- Chen, J., & Brady, P. (2019). Gastroesophageal Reflux Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology Nursing*, 42(1), 20–28.
<https://doi.org/10.1097/SGA.0000000000000359>
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1187–1197. <https://doi.org/10.1177/0022034510376046>
- Conrads, G., & About, I. (2018). Pathophysiology of Dental Caries. In F. Schwendicke, J. Frencken, & N. Innes (A c. Di), *Monographs in Oral Science* (Vol. 27, pagg. 1–10). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000487826>
- Cui, F.-Z., & Ge, J. (2007). New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(3), 185–191. <https://doi.org/10.1002/term.21>

- Elkassas, D., & Arafa, A. (2014). Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry*, 42(4), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.017>
- Fernández-Ferrer, L., Vicente-Ruíz, M., García-Sanz, V., Montiel-Company, J. M., Paredes-Gallardo, V., Almerich-Silla, J. M., & Bellot-Arcís, C. (2018). Enamel remineralization therapies for treating postorthodontic white-spot lesions. *The Journal of the American Dental Association*, 149(9), 778-786.e2. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.05.010>
- Gao, S. S., Zhang, S., Mei, M. L., Lo, E. C.-M., & Chu, C.-H. (2016). Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment – a systematic review. *BMC Oral Health*, 16(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0171-6>
- Gibson, D., Workman, C., & Mehler, P. S. (2019). Medical Complications of Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa. *Psychiatric Clinics of North America*, 42(2), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2019.01.009>
- Giulio, A. B., Matteo, Z., Serena, I. P., Silvia, M., & Luigi, C. (2009). In vitro evaluation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) effect on stripped enamel surfaces. A SEM investigation. *Journal of Dentistry*, 37(3), 228–232. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.11.015>
- Godoi, F. A. de, Carlos, N. R., Bridi, E. C., Amaral, F. L. B. do, França, F. M. G., Turssi, C. P., Kantovitz, K. R., & Basting, R. T. (2019). Remineralizing effect of commercial fluoride varnishes on artificial enamel lesions. *Brazilian Oral Research*, 33, e044. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0044>

- Goldberg, M. (2011). Dentin structure composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience, E3*(2), 711–735. <https://doi.org/10.2741/e281>
- Goldberg, M., & Boskey, A. L. (1996). Lipids and Biomineralizations. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 31*(2), III–187. [https://doi.org/10.1016/S0079-6336\(96\)80011-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6336(96)80011-8)
- Goldman, A. S., Yee, R., Holmgren, C. J., & Benzian, H. (2008). Global affordability of fluoride toothpaste. *Globalization and Health, 4*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1744-8603-4-7>
- González-Cabezas, C., & Fernández, C. E. (2018). Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. *Advances in Dental Research, 29*(1), 55–59. <https://doi.org/10.1177/0022034517740124>
- Grippio, J. O., Simring, M., & Schreiner, S. (2004). Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited. *The Journal of the American Dental Association, 135*(8), 1109–1118. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2004.0369>
- Grzesik, W. J., & Narayanan, A. S. (2002). CEMENTUM AND PERIODONTAL WOUND HEALING AND REGENERATION. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 13*(6), 474–484. <https://doi.org/10.1177/154411130201300605>
- Hara, A. T., & Zero, D. T. (2010). The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. *Dental Clinics of North America, 54*(3), 455–467. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.008>
- Haugejorden, O., & Magne Birkeland, J. (2006). Ecological time-trend analysis of caries experience at 12 years of age and caries incidence from age 12 to 18 years: Norway

1985–2004. *Acta Odontologica Scandinavica*, 64(6), 368–375.

<https://doi.org/10.1080/00016350600856083>

He, L. H., & Swain, M. V. (2008). Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(1), 18–29.

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2007.05.001>

Hellwig, E., & Lussi, A. (2014). Oral Hygiene Products, Medications and Drugs—Hidden Aetiological Factors for Dental Erosion. In A. Lussi & C. Ganss (A c. Di), *Monographs in Oral Science* (Vol. 25, pagg. 155–162). S. KARGER AG.

<https://doi.org/10.1159/000359942>

Iafisco, M., Degli Esposti, L., Ramírez-Rodríguez, G. B., Carella, F., Gómez-Morales, J., Ionescu, A. C., Brambilla, E., Tampieri, A., & Delgado-López, J. M. (2018). Fluoride-doped amorphous calcium phosphate nanoparticles as a promising biomimetic material for dental remineralization. *Scientific Reports*, 8(1), 17016.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35258-x>

Ivanchenko, P., Delgado-López, J. M., Iafisco, M., Gómez-Morales, J., Tampieri, A., Martra, G., & Sakhno, Y. (2017). On the surface effects of citrates on nano-apatites: Evidence of a decreased hydrophilicity. *Scientific Reports*, 7(1), 8901.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09376-x>

Jensdottir, T., Bardow, A., & Holbrook, P. (2005). Properties and modification of soft drinks in relation to their erosive potential in vitro. *Journal of Dentistry*, 33(7), 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.12.002>

Kaufmann, E. N. (2003). *Characterization of Materials, 2 Volume Set*.

- Kleter, G. A. (1998). Discoloration of dental carious lesions (a review). *Archives of Oral Biology*, 43(8), 629–632. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(98\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(98)00048-X)
- Klinge, R. F. (2001). Further Observations on Tertiary Dentin in Human Deciduous Teeth. *Advances in Dental Research*, 15(1), 76–79. <https://doi.org/10.1177/08959374010150011901>
- Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease. *Physiological Reviews*, 97(3), 939–993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>
- Lavigne, G. J., Khoury, S., Abe, S., Yamaguchi, T., & Raphael, K. (2008). Bruxism physiology and pathology: An overview for clinicians. *Journal of Oral Rehabilitation*, 35(7), 476–494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2008.01881.x>
- Li, J., Xie, X., Wang, Y., Yin, W., Antoun, J. S., Farella, M., & Mei, L. (2014). Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *Journal of Dentistry*, 42(7), 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.015>
- Li, Y., Yu, F., Niu, L., Hu, W., Long, Y., Tay, F., & Chen, J. (2018). Associations among Bruxism, Gastroesophageal Reflux Disease, and Tooth Wear. *Journal of Clinical Medicine*, 7(11), 417. <https://doi.org/10.3390/jcm7110417>
- Lippert, F. (2013). An Introduction to Toothpaste—Its Purpose, History and Ingredients. In C. van Loveren (A c. Di), *Monographs in Oral Science* (Vol. 23, pagg. 1–14). S. KARGER AG. <https://doi.org/10.1159/000350456>
- Liu, X.-X., Tenenbaum, H. C., Wilder, R. S., Quock, R., Hewlett, E. R., & Ren, Y.-F. (2020). Pathogenesis, diagnosis and management of dentin hypersensitivity: An

evidence-based overview for dental practitioners. *BMC Oral Health*, 20(1), 220.

<https://doi.org/10.1186/s12903-020-01199-z>

Madani, M., Berardi, T., & Stoopler, E. T. (2014). Anatomic and Examination Considerations of the Oral Cavity. *Medical Clinics of North America*, 98(6), 1225–1238. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.001>

Marinho, V. C., Higgins, J. P., Logan, S., & Sheiham, A. (2003). Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002782>

Meurman, J. H., & Gate, J. M. (1996). Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *European Journal of Oral Sciences*, 104(2), 199–206. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00068.x>

Molaasadolah, F. (2017). In Vitro Evaluation of Enamel Microhardness after Application of Two Types of Fluoride Varnish. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/30121.10412>

Moshaverinia, A., Ansari, S., Movasaghi, Z., Billington, R. W., Darr, J. A., & Rehman, I. U. (2008). Modification of conventional glass-ionomer cements with N-vinylpyrrolidone containing polyacids, nano-hydroxy and fluoroapatite to improve mechanical properties. *Dental Materials*, 24(10), 1381–1390. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.03.008>

Mount, G. J. (2005). Defining, Classifying, and Placing Incipient Caries Lesions in Perspective. *Dental Clinics of North America*, 49(4), 701–723. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.05.012>

- O'Mullane, D. M. (2016). Fluoride and Oral Health. *Community Dental Health*, 33, 69–99.
https://doi.org/10.1922/CDH_3707O'Mullane31
- Orchardson, R., & Cadden, S. W. (2001). An Update on the Physiology of the Dentine–Pulp Complex. *Dental Update*, 28(4), 200–209.
<https://doi.org/10.12968/denu.2001.28.4.200>
- Orsini, G. (2020). In Vitro Investigation of the Effect of Different Remineralizing Agents on Human Enamel. *Modern Approaches in Dentistry and Oral Health Care*, 4(3).
<https://doi.org/10.32474/MADOHC.2020.04.000189>
- Pashley, D. H., Ciucchi, B., Sano, H., Carvalho, R. M., & Russell, C. M. (1995). Bond strength versus dentine structure: A modelling approach. *Archives of Oral Biology*, 40(12), 1109–1118. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(95\)00090-9](https://doi.org/10.1016/0003-9969(95)00090-9)
- Paula, A. B. P., Fernandes, A. R., Coelho, A. S., Marto, C. M., Ferreira, M. M., Caramelo, F., do Vale, F., & Carrilho, E. (2017). Therapies for White Spot Lesions—A Systematic Review. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 17(1), 23–38.
<https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2016.10.003>
- Pepla, E. (2014). Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: A review of literature. *Annali Di Stomatologia*.
<https://doi.org/10.11138/ads/2014.5.3.108>
- Pessan, J. P., & Buzalaf, M. R. A. (2011). Historical and Recent Biological Markers of Exposure to Fluoride. In M. A. R. Buzalaf (A c. Di), *Monographs in Oral Science* (Vol. 22, pagg. 52–65). KARGER. <https://doi.org/10.1159/000325145>

- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17030. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
- Poggio, C., Lombardini, M., Colombo, M., & Bianchi, S. (2010). Impact of two toothpastes on repairing enamel erosion produced by a soft drink: An AFM in vitro study. *Journal of Dentistry*, 38(11), 868–874. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.07.010>
- Rios, D., Honório, H. M., Francisconi, L. F., Magalhães, A. C., Machado, M. A. de A. M., & Buzalaf, M. A. R. (2008). In situ effect of an erosive challenge on different restorative materials and on enamel adjacent to these materials. *Journal of Dentistry*, 36(2), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.11.013>
- Saygin, N. E., Giannobile, W. V., & Somerman, M. J. (2000). Molecular and cell biology of cementum: Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology 2000*, 24(1), 73–98. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240105.x>
- Scheutzel, P. (1996). Etiology of dental erosion ? Intrinsic factors. *European Journal of Oral Sciences*, 104(2), 178–190. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00066.x>
- Schroeder, H. E. (1992). Biological Problems of Regenerative Cementogenesis: Synthesis and Attachment of Collagenous Matrices on Growing and Established Root Surfaces. In *International Review of Cytology* (Vol. 142, pagg. 1–59). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62074-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62074-4)
- Scribante, A., Dermenaki Farahani, M. R., Marino, G., Matera, C., Rodriguez y Baena, R., Lanteri, V., & Butera, A. (2020). Biomimetic Effect of Nano-Hydroxyapatite in Demineralized Enamel before Orthodontic Bonding of Brackets and Attachments:

- Visual, Adhesion Strength, and Hardness in In Vitro Tests. *BioMed Research International*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/6747498>
- Sinfiteli, P. de P., & Coutinho, T. C. L. (s.d.). *Demineralization in a pH cyclic study*. 8.
- Singhal, R. K., & Rai, B. (2017). Remineralization Potential of Three Tooth Pastes on Enamel Caries. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(5), 664–666. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.090>
- Souza, B. M., Comar, L. P., Vertuan, M., Fernandes Neto, C., Buzalaf, M. A. R., & Magalhães, A. C. (2015). Effect of an Experimental Paste with Hydroxyapatite Nanoparticles and Fluoride on Dental Demineralisation and Remineralisation in situ. *Caries Research*, 49(5), 499–507. <https://doi.org/10.1159/000438466>
- Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *Journal of Dental Research*, 90(3), 294–303. <https://doi.org/10.1177/0022034510379602>
- Üstün, N., & Aktören, O. (2019). Analysis of efficacy of the self-assembling peptide-based remineralization agent on artificial enamel lesions. *Microscopy Research and Technique*, 82(7), 1065–1072. <https://doi.org/10.1002/jemt.23254>
- Van der Weijden, F. A., Campbell, S. L., Dörfer, C. E., González-Cabezas, C., & Slot, D. E. (2011). Safety of Oscillating-Rotating Powered Brushes Compared to Manual Toothbrushes: A Systematic Review. *Journal of Periodontology*, 82(1), 5–24. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100393>
- Wang, R. Z., & Weiner, S. (1997). Strain–structure relations in human teeth using Moiré fringes. *Journal of Biomechanics*, 31(2), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(97\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(97)00131-0)

- Weatherell, J. A. (1975). COMPOSITION OF DENTAL ENAMEL. *British Medical Bulletin*, 31(2), 115–119. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071263>
- West, N. X., Lussi, A., Seong, J., & Hellwig, E. (2013). Dentin hypersensitivity: Pain mechanisms and aetiology of exposed cervical dentin. *Clinical Oral Investigations*, 17(S1), 9–19. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0887-x>
- Westmoreland, P., Krantz, M. J., & Mehler, P. S. (2016). Medical Complications of Anorexia Nervosa and Bulimia. *The American Journal of Medicine*, 129(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.06.031>
- Wiegand, A., Burkhard, J. P. M., Eggmann, F., & Attin, T. (2013). Brushing force of manual and sonic toothbrushes affects dental hard tissue abrasion. *Clinical Oral Investigations*, 17(3), 815–822. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0788-z>
- Wierichs, R. J., & Meyer-Lueckel, H. (2015). Systematic Review on Noninvasive Treatment of Root Caries Lesions. *Journal of Dental Research*, 94(2), 261–271. <https://doi.org/10.1177/0022034514557330>
- Yamamoto, T., Hasegawa, T., Yamamoto, T., Hongo, H., & Amizuka, N. (2016). Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Japanese Dental Science Review*, 52(3), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.04.002>
- Yamamoto, T., Li, M., Liu, Z., Guo, Y., Hasegawa, T., Masuki, H., Suzuki, R., & Amizuka, N. (2010). Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. *Odontology*, 98(2), 102–109. <https://doi.org/10.1007/s10266-010-0134-3>
- Yavuz, B. S., & Kargul, B. (2021). Comparative evaluation of the spectral-domain optical coherence tomography and microhardness for remineralization of enamel caries

lesions. *Dental Materials Journal*, 40(5), 1115–1121.

<https://doi.org/10.4012/dmj.2020-279>

Yu, H., Jiang, N., Ye, X., Zheng, H., Attin, T., & Cheng, H. (2018). In situ effect of Tooth Mousse containing CPP-ACP on human enamel subjected to in vivo acid attacks.

Journal of Dentistry, 76, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.05.021>

Zero, D. T. (2009). Recaldent™—Evidence for Clinical Activity. *Advances in Dental Research*, 21(1), 30–34. <https://doi.org/10.1177/0895937409335620>

Zhang, X., Li, Y., Sun, X., Kishen, A., Deng, X., Yang, X., Wang, H., Cong, C., Wang, Y., & Wu, M. (2014). Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(12), 2619–2628.

<https://doi.org/10.1007/s10856-014-5285-2>

