



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Igiene Dentale

**Ruolo delle parodontiti e del microbioma  
nella malattia di Alzheimer**

Relatore: Chiar.ma

**Prof.ssa Rippo Maria Rita**

Tesi di Laurea di:

**Duranti Claudia**

A.A. 2019/2020



*Al mio papà, l'angelo che non mi ha abbandonato  
in questa esperienza così faticosa ma altrettanto bella.*

# Indice

1. Introduzione .....	3
2. La parodontite .....	5
2.1 L'epidemiologia della parodontite.....	6
2.2 L'eziologia e la fisiopatologia della parodontite .....	6
2.3 La nuova classificazione delle parodontiti .....	9
2.4 Valutazione e trattamento delle Parodontiti .....	11
2.5 Farmacoterapia locale nel trattamento delle parodontiti .....	15
3. La malattia di Alzheimer.....	17
3.1 L'epidemiologia della malattia di Alzheimer .....	18
3.2 La storia della malattia di Alzheimer.....	18
3.3 L'eziologia e fattori di rischio della Malattia di Alzheimer .....	19
3.4 Prevenzione e cura.....	22
4. Associazione tra microbioma, parodontite e AD .....	25
4.1 La salute orale e la funzione cognitiva .....	25
4.1.1 I biomarcatori orali per la diagnosi della malattia di Alzheimer.....	26
4.1.1.1 Composti organici volatili (COV) .....	27
4.1.1.2 Proteomica e lipidomica salivare.....	28
4.1.1.3 Microbioma orale .....	29
4.2 Il ruolo del microbioma orale nelle patologie orali e sistemiche.....	30
4.2.1 Patologie orali correlate alla disbiosi orale .....	32
4.2.1.1 La carie dentale.....	34
4.2.1.2 La malattia parodontale .....	35
4.2.2 Patologie sistemiche correlate alla disbiosi orale.....	37
4.2.3 La disbiosi orale e il meccanismo d'azione patogeno nell'AD.....	43
4.3 La parodontite e la malattia di Alzheimer: studi e ricerche sulla loro correlazione ..	48
4.3.1 Parodontite e AD: Lo stato dell'arte.....	50
4.4 La parodontite nella progressione dell'AD.....	53
4.4.1 Batteriemia e teoria infiammatoria.....	55
4.4.2 Il meccanismo di <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	58
4.4.2.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i> e il suo LPS nella malattia di Alzheimer .....	61
4.4.2.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> e la gingipain nella malattia di Alzheimer .....	64
4.4.2.3. <i>Porphyromonas gingivalis</i> e gli inflammasomi .....	68

4.4.2.4.	Porphyromonas gingivalis e il sistema del complemento nell'AD.....	70
4.4.2.5.	P. gingivalis e citrullinazione nell'AD.....	73
4.4.2.6.	P. gingivalis e l'iperfosforilazione della tau .....	75
4.4.3	Il ruolo dell' <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> nell'AD.....	76
5.	Il ruolo dell'igienista dentale nella cura di pazienti con AD .....	80
6.	Conclusioni .....	84
	Bibliografia.....	88
	Allegati .....	101
	Ringraziamenti .....	103

## 1. Introduzione

Negli ultimi anni è emersa una correlazione significativa tra la patologia di Alzheimer e la malattia parodontale, più precisamente la parodontite. Il mio elaborato è frutto di un'attenta ricerca, principalmente su PubMed, degli studi scientifici attualmente pubblicati e che punta ad approfondire come non solo la malattia di Alzheimer può causare uno squilibrio della salute parodontale, ma anche di come la parodontite possa essere un fattore eziologico nelle malattie neurodegenerative. Nel primo caso, le parodontiti, possono essere dovute anche alla perdita delle capacità cognitive (la persona con Alzheimer, ad esempio, può non riconoscere un semplice spazzolino da denti o non riuscire ad utilizzarlo) e delle abitudini quotidiane di corretta igiene orale.

Gli igienisti dentali, come professionisti della salute, non hanno solo il compito di eseguire l'igiene orale professionale, ma devono istruire il paziente ad una buona igiene orale domiciliare, motivandone le ragioni che non risiedono esclusivamente nell'aspetto estetico e funzionale della masticazione e della digestione, ma nel rischio di sviluppare altre patologie associate a disfunzioni ed infezione del parodonto. Per questo sono fondamentali formazione, informazione, studio e ricerca continui sull'eziopatogenesi delle parodontiti stesse e delle malattie ad esse associate. Esistono moltissime correlazioni tra le parodontiti, infiammazione e patologie sistemiche come ad esempio il diabete, l'artrite reumatoide, malattie cardiovascolari e neurodegenerative, tra cui l'Alzheimer.

L'attenzione per queste tematiche è nata da un contatto diretto con la mia nonna materna, malata di Alzheimer ormai da parecchio tempo. Vivere la sua condizione come caregiver ha suscitato in me attente riflessioni inerenti all'importanza della salute orale e il ruolo che in essa rivestono i professionisti della salute. Nella quotidianità ho avuto modo di comprendere meglio le problematiche collegate a questa tipologia di malattia, quanto la nostra società sia ancora troppo

poco sensibilizzata riguardo a questo tema e di quanto invece sia importante la prevenzione, in modo da intercettare tutti i possibili fattori di rischio che potrebbero favorirne l'insorgenza o accelerarla. La curiosità di comprendere con quali meccanismi la parodontite possa influire sull'Alzheimer è stata inoltre alimentata dai recenti studi scientifici che approfondiscono tale relazione. La mia tesi è articolata in sei capitoli; questo di presentazione è il primo. Nel secondo e terzo capitolo ci addentriamo sulle caratteristiche generali della parodontite e della malattia di Alzheimer, evidenziando principalmente l'epidemiologia, l'eziologia, i fattori di rischio e il loro trattamento. Il quarto capitolo, definito come il cuore della tesi, approfondisce la relazione tra le due malattie. Partendo dal rapporto della salute orale con la funzione cognitiva, viene confermata l'importanza del microbioma orale e di quanto la sua disbiosi possa influire, non solo sulle patologie orali, ma anche su quelle sistemiche. Successivamente, verranno illustrati i diversi studi che mettono in correlazione la parodontite con la malattia di Alzheimer. Infine verrà analizzato il ruolo dei due principali batteri parodontopatogeni, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, insieme ai loro fattori di virulenza, sottolineando i meccanismi che influenzano la patogenesi dell'Alzheimer. Nel quinto capitolo verrà evidenziato il ruolo dell'igienista dentale e più in generale del mondo odontoiatrico nei confronti di questi pazienti. La ricerca conferma quanto troppo spesso queste persone vengano abbandonate e non siano fornite di alcun tipo di assistenza sanitaria orale. Nell'ultimo capitolo, saranno riportate le conclusioni del mio lavoro di tesi, insieme ai risultati più significativi.

## 2. La parodontite

Le malattie parodontali sono infezioni determinate da microrganismi che colonizzano la superficie del dente a livello del margine gengivale o al di sotto. Vengono suddivise in gengivite e parodontite [1].

Tra tutte le malattie parodontali, la gengivite è considerata la più comune ed è un'inflammazione della gengiva che rimane limitata all'area dei tessuti molli dell'epitelio gengivale e del tessuto connettivo, pertanto non è caratterizzata dalla perdita di attacco clinico. Dall'esame obiettivo si rileva gonfiore, arrossamento e sanguinamento al sondaggio. A seguito del World Workshop di Chicago del 2017 è stata introdotta la nuova classificazione delle malattie parodontali (gengivite e parodontite) e delle malattie peri-implantari; Secondo la nuova classificazione, esistono due forme di gengivite: la gengivite placca indotta e la gengivite no placca indotta. Le condizioni gengivali placca indotte possono essere associate a solo biofilm dentale, oppure mediate da fattori sistemici e locali o infine, dalle alterazioni gengivali influenzate da farmaci. Le condizioni gengivali no placca indotte, non sono correlate alla presenza di biofilm, ma da altre problematiche di tipo generale (condizioni immunitarie ed infiammatorie, malattie endocrine, metaboliche e nutrizionali ecc.) [2]. Se il paziente ha una gengivite indotta da placca, la rimozione dell'agente patogeno, quale la placca batterica, determina la completa *restitutio ad integrum* del tessuto gengivale [3].

Il termine "parodontite" è composto dalle due parole, cioè *periodont* (struttura che circonda i denti) e *itis* (inflammazione) [4]. Indica dunque una condizione infiammatoria e patologica. Secondo la nuova classificazione la parodontite è definita una malattia infiammatoria cronica multifattoriale associata alla presenza di biofilm di placca disbiotica e caratterizzata dalla progressiva distruzione dell'apparato di supporto del dente. Le sue caratteristiche principali includono la perdita del supporto del tessuto parodontale, che si manifesta attraverso la perdita

di attacco clinico (CAL, determinato dalla somma della profondità della tasca parodontale e della recessione), la perdita di osso alveolare valutata radiograficamente, la presenza di tasche parodontali e il sanguinamento gengivale [2].

## 2.1 L'epidemiologia della parodontite

Diverse ricerche epidemiologiche hanno dimostrato a partire dagli anni '50 che le malattie parodontali, tra cui la parodontite, erano presenti principalmente nella popolazione adulta e aumentavano in proporzione all'età. Negli anni '60 Scherp (1964), riesaminò gli studi riguardanti l'epidemiologia della malattia parodontale e concluse che questa patologia colpisce prevalentemente la popolazione adulta tra i 35-40 anni di età, può avere come esordio una gengivite in età giovanile non curata e in più del 90% dei casi la gravità era associata all'età e alla scarsa igiene orale. Negli anni '80 gli studi epidemiologici si concentrarono maggiormente sull'estensione della malattia e sulla sua gravità espressa dall'entità della perdita di sostegno del tessuto parodontale concludendo che il rischio di sviluppare parodontite non è distribuito in modo omogeneo nella popolazione e solo il 5-20% della popolazione soffre di forme gravi di malattie parodontali. Attualmente si può affermare che la suscettibilità alla malattia parodontale aumenta all'aumentare dell'età, in particolar modo dopo i 35 anni di età. Coesistono diversi fattori di rischio (che verranno descritti nel paragrafo successivo) capaci di modulare la suscettibilità o la resistenza alla parodontite e la sua prevalenza non è distribuita in modo uniforme tra le popolazioni di diversa etnia, razza o gruppi socioeconomici [1].

## 2.2 L'eziologia e la fisiopatologia della parodontite

La parodontite viene definita una patologia ad eziologia multifattoriale. Lo sviluppo di tale malattia dipende principalmente dalla colonizzazione della placca batterica mista nel tessuto

orale come descritto dagli studi pionieristici di Loe e collaboratori pubblicati nel 1965, sulla "Gengivite sperimentale nell'uomo". Il loro studio prevedeva l'interruzione delle misure di igiene orale domiciliare in un arco di tempo compreso tra 7 e 21 giorni. Al termine dello studio, si notava clinicamente in tutti i pazienti lo sviluppo di una gengivite reversibile entro 7-10 giorni dal ripristino delle misure di igiene orale [5].

Ulteriori studi di Theilade et al. nel 1966, dimostrarono la differente popolazione batterica che colonizza il cavo orale in condizioni di salute o di malattia parodontale: nel primo caso erano maggiormente presenti batteri Gram-positivi in uno stato di salute parodontale, mentre nel secondo caso i Gram-negativi [4]. Oltre alla placca batterica, coesistono numerosi fattori di rischio modificabili e non. Quelli modificabili sono l'igiene orale inadeguata, le anomalie dentarie (affollamenti o dislocazioni dentarie, malocclusioni, odontoiatria "iatrogena"), il fumo, lo stress, il diabete, la gravidanza; mentre i fattori di rischio non modificabili includono l'età, l'ereditarietà e le malattie genetiche. Questi fattori di rischio concorrono modificando la suscettibilità alla malattia da parte dell'individuo [6]. Ampi studi trasversali hanno dedotto che il sesso maschile, l'origine nera o filippina, l'età avanzata, il basso livello socioeconomico o d'istruzione e condizioni patologiche sistemiche, contribuiscono nell'eziologia della parodontite [1].

Per capire la fisiopatologia della malattia parodontale, è essenziale conoscere il complesso biofilm dentale e la risposta immunitaria associata alla parodontite. La placca dentale è un biofilm complesso costituito da diversi batteri racchiusi da una matrice protettiva la quale è composta da polisaccaride extracellulare e glicoproteine che forniscono un ambiente protettivo per i microbi rendendolo da 1000 a 1500 volte più resistente agli agenti antimicrobici. La placca dentale, per diverse concentrazioni di pH e metaboliti, ha vari microambienti all'interno del biofilm e ciò favorisce la presenza di una numerosa varietà di microbi che vivono nella stessa

placca dentale. All'interno del biofilm troviamo i vari canali circolatori che aiutano la distribuzione dei nutrienti e l'escrezione dei rifiuti metabolici generati. La comunicazione tra le microcolonie di batteri all'interno del biofilm dentale è definita "Quorum sensing". Quando la placca batterica si viene a creare sulla superficie dentale, lo strato iniziale prende il nome di "pellicola acquisita". Questo strato si forma entro pochi secondi dall'esposizione delle superfici dei denti, seguito dall'attaccamento iniziale dei primi colonizzatori del biofilm ovvero le specie *Streptococcus* e *Actinomyces*, batteri facoltativi e Gram-positivi. I "recettori dell'adesina" presenti sulla superficie dei colonizzatori primari si legano alle proteine ricche di prolina della pellicola acquisita. A poco a poco si verifica un deposito, strato dopo strato di placca dentale che porta a una carenza di ossigeno nell'ambiente favorendo la colonizzazione di batteri anaerobici. Il microbo a ponte tra colonizzatori primari e secondari è la specie *Fusobacterium*. Il graduale spostamento da condizioni aerobie a condizioni anaerobie determina la progressione della gengivite in parodontite [4]. Diversi studi hanno dimostrato che quasi 800 diverse specie batteriche sono presenti nella placca dentale umana [7]. Man mano che la malattia parodontale progredisce dalla gengivite alla parodontite, un numero maggiore di organismi anaerobici colonizza le tasche parodontali più profonde, come *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* che innescano la risposta infiammatoria dell'ospite. Questa risposta include la produzione e la diffusione della proteina C-reattiva (CRP), un biomarcatore dell'infiammazione, nonché vari mediatori prodotti dai neutrofili e macrofagi come il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- $\alpha$ ), le metalloproteinasi della matrice (MMP) e le interleuchine (IL-1 e IL-8) [6]. Perciò quando queste specie parodontopatogene invadono i tessuti gengivali determinando l'infezione batterica, nell'ospite viene attivata la risposta immunitaria innata responsabile di infiammazione acuta (con tipici segni che la caratterizzano: arrossamento, gonfiore e sanguinamento gengivale), e della successiva attivazione dell'immunità acquisita.

Quando la risposta immunitaria è efficace, non ci sono danni ai tessuti che circondano il dente e l'insulto batterico viene rimosso efficacemente. Tuttavia, quando le specie microbiche continuano a crescere, o se c'è una risposta immunitaria alterata, l'infiammazione parodontale acuta diventa cronica con produzione di mediatori che provocano nel tempo il riassorbimento dell'osso alveolare da parte degli osteoclasti e la degradazione delle fibre legamentose da parte delle MMP, nonché la formazione del tessuto di granulazione [7].

### 2.3 La nuova classificazione delle parodontiti

Nel 2017 l'American Academy of Periodontology, in collaborazione con la European Federation of Periodontology, ha introdotto la nuova classificazione delle malattie parodontali (gengivite e parodontite) e peri-implantari. Le novità introdotte sono state molteplici e le più importanti rispetto alla vecchia classificazione di Armitage del 1999, prevedevano il concetto di salute parodontale in un parodonto intatto e in un parodonto ridotto. Il parodonto intatto è una condizione in cui non si è verificata perdita di attacco clinico, mentre il parodonto ridotto può essere dovuto a diverse condizioni: paziente che ha avuto parodontite ed è ora sotto controllo, o paziente che non ha avuto parodontite ma ha una perdita di attacco clinico dovuto alla presenza di recessioni [8]. Un'altra novità del workshop del 2017 è la nuova classificazione delle parodontiti. Armitage divideva principalmente le parodontiti in cronica, aggressiva e ulcerativa necrotizzante. Nella nuova classificazione, le parodontiti, vengono classificate in tre grandi gruppi:

- Malattie parodontali necrotizzanti;
- Parodontite;
- Parodontite come manifestazione di malattie sistemiche.

Secondo le linee guida pubblicate recentemente nel 2017, le parodontiti si classificano ulteriormente in base allo stadio e al grado. Lo stadio definisce la gravità e l'entità della gestione richiesta e viene assegnata una fase che dipende da diversi fattori quali la perdita di attacco clinico, la perdita radiografica dell'osso e la perdita dei denti.

Stadio I: parodontite iniziale;

Stadio II: parodontite moderata;

Stadio III: grave parodontite con possibilità di ulteriore perdita dei denti;

Stadio IV: parodontite grave con possibilità di perdita della dentatura [6] (Fig.1).

Periodontitis stage		Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Severity	Interdental CAL at site of greatest loss	1-2mm	3-4mm	≥ 5mm	
	Radiographic bone loss	Coronal third (< 15%)	Coronal third (15-33%)	Extending to the middle third of the root or beyond	
	Periodontitis-associated tooth loss	No tooth loss from periodontitis		Tooth loss from periodontitis of ≤ 4 teeth	Tooth loss from periodontitis of ≥ 5 teeth
Complexity	Local	Maximum probing depth: ≤ 4mm Mostly horizontal bone loss	Maximum probing depth: ≤ 5 mm Mostly horizontal bone loss	In addition to Stage II complexity: • Probing depth: ≥ 6mm • Vertical bone loss: ≥ 3mm • Furcation involvement (Class II or III) • Moderate ridge defect	In addition to Stage III complexity: • Need for complex rehabilitation because of masticatory dysfunction • Secondary occlusal trauma, bite collapse, tooth drifting and/or flaring • Severe ridge defect
		Extent & distribution: Add to stage as descriptor. For each stage, describe extent as (1) localised (<30% of teeth involved), (2) generalised, or (3) molar-incisor pattern.			

**Figura 1.** Classificazione delle parodontiti in base allo stadio [9].

Il grado, invece, definisce la progressione della malattia, valutando negli ultimi cinque anni la perdita di attacco o di osso radiografico, il fenotipo dell'ospite, il rapporto tra la perdita di osso radiografico e l'età, e altri fattori di rischio associati come il fumo e il diabete mellito:

Grado A: bassa velocità di progressione;

Grado B: progressione attesa;

Grado C: alto rischio di progressione [6] (Fig. 2).

			Grade A	Grade B	Grade C
Primary criteria	Direct evidence of progression	Longitudinal data (radiographic bone loss or attachment loss)	Evidence of no loss over 5 years	< 2mm over 5 years	≥ 2mm over 5 years
	Indirect evidence of progression	Percent bone loss/age	< 0.25	0.25 - 1.0	> 1.0
		Case phenotype	Heavy biofilm deposits with low levels of destruction	Destruction commensurate with biofilm deposits	Destruction disproportionate to biofilm deposits
Grade modifiers	Risk Factors	Smoking Diabetes	Non-smoker Normoglycaemic with or without prior diagnosis of diabetes	Smoker < 10 cigarettes/day HbA1c < 7.0% in diabetes patient	Smoker ≥ 10 cigarettes/day HbA1c ≥ 7.0% in diabetes patient

Figura 2. Classificazione delle parodontiti in base al grado [9].

## 2.4 Valutazione e trattamento delle Parodontiti

Per diagnosticare la parodontite si ha bisogno di diverse valutazioni quali: l'esame obiettivo, il sondaggio parodontale (valutandone la profondità di sondaggio, la perdita di attacco clinico e il sanguinamento gengivale), e i livelli ossei osservati radiograficamente. Un parodonto clinicamente sano, è caratterizzato da una gengiva punteggiata di colore rosa corallo ben adattata all'osso sottostante. Tra la gengiva e il dente è presente un solco fisiologico da 1 a 3 mm che normalmente non mostra segni di sanguinamento anche se, secondo la nuova classificazione, in presenza di un lieve sanguinamento al sondaggio siamo in una condizione di salute parodontale clinica (BoP ≤ 10%). Comparativamente, i segni di un parodonto malato includono sanguinamento al sondaggio, dolore, alitosi, tasche parodontali, perdita ossea radiografica, perdita di attacco clinico e perdita dei denti. Le radiografie di un paziente con parodontite mostreranno la perdita di osso alveolare in prossimità di una profondità del sondaggio parodontale e ciò significa che si ha la presenza di patogeni parodontali che stanno

attivando la risposta dell'ospite. Se non trattata, la perdita ossea progredirà fino a quando vi sarà un supporto dentale inadeguato e il dente associato diventerà mobile e alla fine andrà perso [6].

Riguardo al trattamento delle parodontiti, secondo le linee guida della Società Italiana di Parodontologia e Implantologia, si prevede come fase iniziale del trattamento un approccio graduale che inizia con opzioni più conservative. Dopo aver definito la diagnosi del paziente in parodontite, si prevede una fase iniziale in cui il professionista esegue la terapia causale associata alla terapia meccanica non chirurgica (levigatura radicolare). Terminata la fase iniziale, si procede con la prima valutazione in cui vengono valutati dei criteri di successo da raggiungere: placca batterica non superiore al 30%, sanguinamento gengivale non superiore al 30%, riduzione della profondità di sondaggio delle tasche parodontali presenti. Se i primi due obiettivi non vengono raggiunti, si procede a ripetere di nuovo la prima fase finché non vengono acquisiti i criteri di successo; invece, se i criteri di successo vengono raggiunti, si prosegue alla fase due che prevede di stimare se è necessaria la terapia chirurgica oppure no. La terapia chirurgica viene consigliata quando si ha la presenza di tasche con profondità di sondaggio uguale o maggiore di 5mm, presenza di coinvolgimento di forcazioni, necessità di ricostruire o rigenerare il supporto parodontale, necessità di modificare la posizione o volume gengivale e necessità di sostituire mediante impianti, elementi dentali persi. Dopo aver eseguito la terapia chirurgica verrà eseguita una nuova rivalutazione per vedere se sono stati raggiunti i criteri di successo. Se il paziente non ha avuto necessità della terapia chirurgica o ha raggiunto i criteri di successo dopo terapia chirurgica, viene inserito in un programma di supporto parodontale con una rivalutazione periodica per accertare la stabilità dei risultati raggiunti con la terapia [10].

Il professionista ha anche l'importante compito di gestire i fattori di rischio che determinerebbero la parodontite. Il primo obiettivo è quello di correggere i fattori di rischio

modificabili, le tecniche di igiene orale inadeguate, spiegandogli e mostrandogli le varie tecniche di igiene orale domiciliare, i vari presidi e indicargli quelli più adeguati nel suo caso e inserire il paziente nei richiami periodici per l'igiene orale professionale. La letteratura ha dimostrato come le pratiche di igiene orale inadeguate portino ad uno sviluppo delle malattie parodontali causate da un accumulo di placca batterica disbiotica sulle superficie dentali, causando inizialmente la gengivite e se non curata progredendo in parodontite. Difatti, quando abbiamo un'igiene orale impropria, gli organismi anaerobici responsabili della progressione delle malattie parodontali possono colonizzare nelle zone più profonde del parodonto dando luogo ad un'iniziale distruzione parodontale. I principali batteri presenti nella parodontite includono: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Quando gli viene permesso di penetrare in profondità nel parodonto, questi organismi producono infiammazione innescando il rilascio di mediatori infiammatori e altri prodotti difensivi dall'ospite. Nella nuova classificazione delle parodontiti, il fumo è stato inserito come fattore di rischio modificabile nella valutazione del grado. Il fumo di tabacco infatti può aumentare il rischio di malattie parodontali di 5-20 volte e il rischio è direttamente proporzionale al numero delle sigarette fumate nell'arco di una giornata [6]. La severità della perdita di attacco aumenta dello 0.5% nelle persone che fumano una sigaretta al giorno, del 5% nelle persone che fumano da dieci a venti sigarette al giorno e del 20% oltre le venti sigarette al giorno [11]. Nei pazienti fumatori è stato riportato che possono presentare un indice di placca significativamente maggiore e che l'indice di sanguinamento nei fumatori (27%) è inferiore rispetto ai non fumatori (40%). La preponderanza di prove suggerisce che il fumo può ridurre il sanguinamento gengivale e che ciò può verificarsi a causa di cambiamenti nella proporzione dei vasi sanguigni nei tessuti parodontali [12]. Inoltre, il fumo di tabacco è associato a maggiori livelli di perdita ossea, perdita di attacco, tasche parodontali profonde

associate alla malattia e perdita dei denti, rispetto ai non fumatori. Oltre all'aumentata gravità delle malattie parodontali, il fumo di tabacco è anche associato a una significativa diminuzione dell'efficacia dei trattamenti [6].

Un altro fattore di rischio modificabile è il diabete mellito, una malattia metabolica cronica anch' esso inserito nella nuova classificazione delle parodontiti per stabilire il grado della malattia. In particolare viene valutata l'emoglobina glicosilata, ovvero il prodotto di una reazione non enzimatica tra emoglobina e glucosio e che riflette l'eccesso di glucosio plasmatico medio dei due o tre mesi precedenti [13].

Il diabete mellito è caratterizzato infatti da iperglicemia dovuta a un difetto nella produzione di insulina da parte delle cellule  $\beta$  pancreatiche (diabete di tipo 1), una diminuzione della sensibilità all'insulina (diabete di tipo 2) o una combinazione di entrambi che può colpire gli adulti, adolescenti e bambini.

Il diabete mellito e la parodontite presentano un'associazione "bidirezionale" in cui l'una influisce sull'altra. L'infezione cronica presente in un paziente con parodontite, può causare risposte infiammatorie esacerbate che a loro volta possono provocare uno scarso controllo metabolico della glicemia e un aumento del fabbisogno di insulina.

Al contrario, il diabete può determinare diverse complicazioni come scarsa guarigione delle ferite, retinopatia, nefropatia, neuropatia, malattia macrovascolare e parodontite. Infatti, gli individui diabetici hanno un triplice aumento del rischio di parodontite, rispetto ai soggetti non diabetici [14].

Un altro fattore di rischio è la gravidanza, caratterizzata da cambiamenti ormonali che hanno dimostrato di promuovere una risposta infiammatoria legata a gengiviti e parodontiti. Sebbene non chiaramente compresi, gli ormoni materni hanno dimostrato di essere positivamente

correlati ai livelli di *Porphyromonas gingivalis*, un microbo chiave nella progressione della malattia parodontale.

La letteratura riporta anche l'età come un fattore di rischio non modificabile delle malattie parodontali. Diversi studi hanno dimostrato che i soggetti più anziani presentano una risposta infiammatoria più intensa nei confronti della placca batterica, e quindi un maggior rischio di subire la distruzione del parodonto. A questo si associa una maggiore difficoltà a svolgere le pratiche di igiene orale domiciliare che inevitabilmente produce un indice di placca maggiore, anch'esso fattore di rischio noto per lo sviluppo di malattie parodontali.

Infine, è stato dimostrato che nei soggetti con malattie genetiche sistemiche come la sindrome di Down, la sindrome di Ehlers-Danlos (tipi IV e VIII) e il morbo di Crohn, possono manifestare malattie parodontali [6].

## 2.5 Farmacoterapia locale nel trattamento delle parodontiti

La parodontite, come abbiamo visto precedentemente secondo la SIdP, è una patologia che viene trattata principalmente mediante la terapia causale e levigatura radicolare. In alcuni casi questo trattamento non è sufficiente e si ha la necessità di utilizzare degli agenti farmacoterapeutici come coadiuvanti locali.

L'impiego di antibiotici applicati localmente in siti parodontali e/o perimplantari, rappresenta un'ulteriore strategia terapeutica in alternativa alla terapia antibiotica sistemica laddove si ravvedano limiti e controindicazioni [15].

Gli antibiotici locali vengono impiegati in alcune situazioni particolari quali: i siti locali non responsivi o ricorrenti durante la terapia parodontale di supporto, la presenza di tasche residue nella zona estetica, in cui la chirurgia può compromettere l'estetica o la fonetica, e persistenti sacche sanguinanti nei siti intraossei. I pazienti fumatori, diabetici, con un'igiene orale

inadeguata o con controindicazioni relative o assolute all'intervento chirurgico, possono trarre beneficio dall'impiego di antibiotici locali [16].

Un antibiotico locale per essere efficace deve avvalersi di alcune caratteristiche: il principio attivo del farmaco deve essere in grado di entrare in contatto con i batteri bersaglio; deve raggiungere concentrazioni terapeuticamente efficaci in situ; deve mantenerle per un tempo sufficientemente lungo; non deve diffondere o essere assorbito a livello sistemico; deve offrire maneggevolezza clinica e comfort per il paziente.

I farmaci locali disponibili in commercio possono essere suddivisi in due grandi categorie: farmaci locali a rilascio controllato (>24h) e farmaci locali a rilascio sostenuto (<24h).

Nei farmaci locali a rilascio controllato (controlled-release), il farmaco viene rilasciato in concentrazioni predeterminate per un periodo di tempo definito (giorni, settimane, anni). I più utilizzati sono il gel di metronidazolo e le microsfele di minociclina.

Mentre, nei farmaci locali a rilascio lento o sostenuto (slow-release o sustained-release), il farmaco viene rilasciato tutto nell'arco delle 24 ore. I farmaci presenti nel commercio sono le fibre di tetraciclina, il polimero di doxiciclina e le tavolette di clorexidina [15].

La letteratura afferma che l'utilizzo della terapia antimicrobica locale non dà ulteriori vantaggi se utilizzati come monoterapia rispetto alla terapia meccanica convenzionale. Si consiglia di utilizzarli qualora sono presenti dei siti che non rispondono positivamente alla sola terapia meccanica o in terapia di mantenimento.

### 3. La malattia di Alzheimer

L'Alzheimer è una malattia neurodegenerativa con eziologia multifattoriale, ovvero, è causata da più fattori diversi e non collegati direttamente tra di loro che concorrono ad innescare la degenerazione a livello celebrale [17].

Un paziente affetto dal morbo di Alzheimer (AD), presenta una fase iniziale caratterizzata dal progressivo deterioramento delle funzioni cognitive. Clinicamente questi pazienti presentano la perdita della memoria, la difficoltà di risolvere i problemi, la perdita o il posizionamento errato di oggetti e i cambiamenti di umore e personalità. Con il passare degli anni la malattia progredisce compromettendo gli altri campi cognitivi legati al linguaggio, comprensione logica, orientamento, funzione esecutiva, giudizio, comportamento e difficoltà motorie [18]. I pazienti con diagnosi di AD, non riconoscono più i membri della loro famiglia, gli amici oppure non riescono più a svolgere delle semplici azioni quotidiane come vestirti, lavarsi, cucinare. Nelle fasi ancora più avanzate, le persone con Alzheimer potrebbero essere costrette a letto, avere difficoltà a comunicare, deglutire, controllo della funzione dell'intestino e della vescica [19].

Dal punto di vista istopatologico, l'AD è caratterizzata da atrofia cerebrale, placche amiloidi (depositi extracellulari di aggregati peptidici  $A\beta$ ), grovigli neurofibrillari (composti principalmente da proteina tau), perdita di neuroni, sinapsi e distrofia neuritica [20].

L'atrofia cerebrale è dovuta alla morte dei neuroni e alla degenerazione delle sinapsi, in particolare a livello dell'ippocampo che è la regione responsabile della memoria e dell'orientamento spaziale. Le placche amiloidi, uno dei tratti distintivi dell'AD, sono costituite dal peptide amiloide- $\beta$  agglutinato (principalmente  $A\beta$  1-40 / 42) contenente strutture  $\beta$ -sheet che formano fibrille. L'accumulo di peptide  $\beta$  amiloide è causato da un disturbo dell'omeostasi dei peptidi  $\beta$  amiloide derivante dalla degradazione proteolitica della proteina precursore dell'amiloide (APP) [18].

### 3.1 L'epidemiologia della malattia di Alzheimer

Secondo l'Associazione di Alzheimer, l'AD rappresenta il 50-75% dei casi di demenza nelle persone anziane di età maggiore ai 60 anni. Le persone affette da AD sono più di 35 milioni in tutto il mondo e oltre 10 milioni in Europa [21]. In Italia, secondo l'Istat, circa 1 milione di persone sono colpite da questa malattia e circa 3 milioni sono direttamente o indirettamente coinvolte nell'assistenza dei loro cari. Si ipotizza che tra circa 40 anni la malattia di Alzheimer potrebbe triplicare [22].

### 3.2 La storia della malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer nacque nel 1907 grazie ad Aloysius "Alöis" Alzheimer, psichiatra e neuropatologo tedesco il quale descrisse i sintomi di una donna di 51 anni, Auguste Deter, che la stava curando presso il manicomio di Francoforte in Germania. Il dottor Alzheimer, curando questa paziente, si mise a scrivere le caratteristiche di questa peculiare patologia:

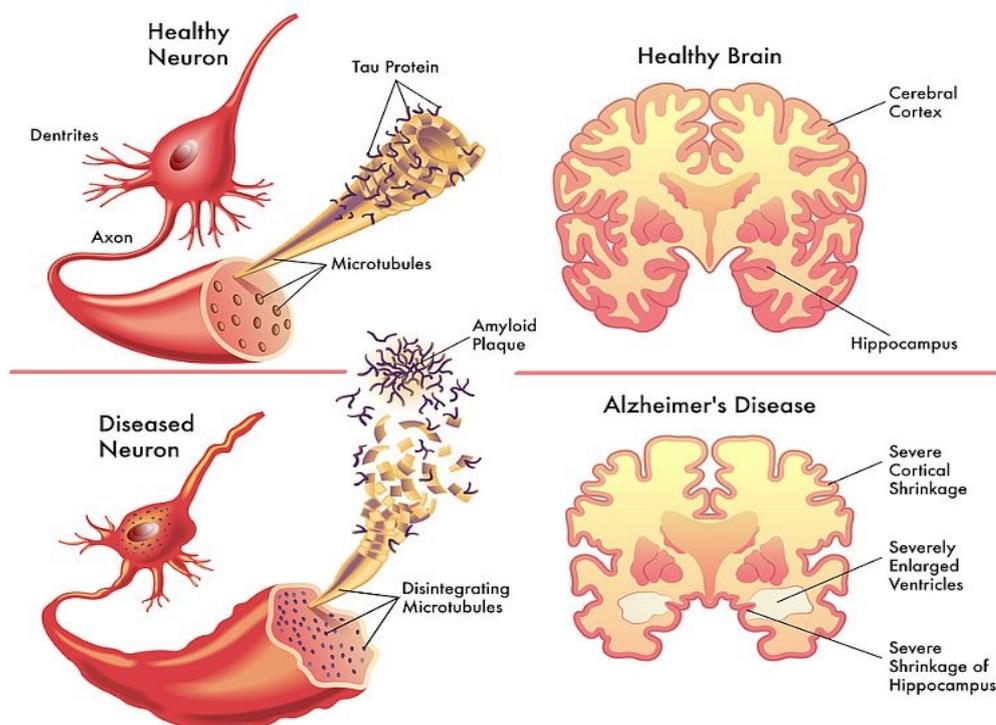
*“La sua memoria è seriamente compromessa. Se le vengono mostrati degli oggetti, li nomina correttamente, ma quasi subito dopo ha dimenticato tutto. Durante la lettura di un test, salta di riga in riga o legge scrivendo le parole individualmente o rendendole prive di significato attraverso la sua pronuncia. Nello scrivere ripete sillabe separate molte volte, ne omette altre e rapidamente si scompone completamente. Nel parlare, usa riempimenti e alcune espressioni parafrasate ("versatore di latte" invece di tazza); a volte è ovvio che non può andare avanti. È chiaro che non capisce certe domande. Non ricorda l'uso di alcuni oggetti.”*

Quando la paziente morì, il dottor Alzheimer usò la nuova tecnica di colorazione dell'argento per esaminare microscopicamente il suo cervello. Osservò le placche neuritiche, i grovigli

neurofibrillari e l'angiopatia amiloide, che sarebbero poi diventati i segni distintivi della malattia [23].

### 3.3 L'eziologia e fattori di rischio della Malattia di Alzheimer

Dal punto di vista fisiopatologico, nella malattia di Alzheimer si osservano a livello cerebrale, due caratteristiche principali: minuscole ma numerosissime placche di beta-amiloide ( $A\beta$ ) e grovigli neurofibrillari di proteina tau-iperfosforilata (p-tau). La proteina tau-iperfosforilata e la beta-amiloide (nello specifico la variante  $A\beta_{1-42}$ ) sono proteine prodotte dal cervello che non riesce più ad eliminare. Entrambe queste proteine determinano un alto grado di tossicità a livello cerebrale iniziando a danneggiare i neuroni già molti anni prima che compaiano i disturbi di memoria. La morte cellulare ha inizio in una regione del cervello che si chiama ippocampo, situato nel lobo temporale, responsabile dei processi di apprendimento e memoria fino a coinvolgere l'intero cervello compromettendo ulteriormente l'attività cognitiva e funzionale. Non è ancora del tutto noto quale sia il meccanismo alla base della formazione delle placche amiloidi, dei grovigli neurofibrillari e di oligomeri di beta-amiloide i quali, come le placche amiloidi, sarebbero anch'essi potenzialmente neurotossici. Inoltre, l'anomalo rilascio di neurotrasmettitori, come il glutammato, contribuirebbe anch'esso a morte neuronale e processi infiammatori all'interno del cervello. Il processo neuroinfiammatorio risulta essere allo stesso modo coinvolto nella complessa cascata di processi che causano la malattia di Alzheimer e i successivi sintomi. Questo processo risulta essere quindi implicato sia nella patogenesi della malattia di Alzheimer che nella sua progressione [17] (Fig.3).



**Figura 3.** La differenza tra un cervello sano e un cervello malato di Alzheimer. Le placche amiloidi insieme alle proteine tau iperfosforilate, costituiscono i tratti distintivi dell'Alzheimer [24].

I fattori di rischio della malattia di Alzheimer si possono suddividere in fattori modificabili e fattori non modificabili.

I fattori di rischio modificabili sono tutti quelli inerenti allo stile di vita: il fumo di sigaretta, l'assunzione di alcool, la carenza di vitamine, uno stile alimentare poco sano, la scarsa attività fisica, mentale e sociale e bassa scolarità. Anche il diabete, l'ipercolesterolemia, l'ipertensione, l'obesità e la dislipidemia rappresentano altri fattori di rischio associati all'Alzheimer. Storie pregresse di traumi cerebrali, patologie cerebrovascolari, vasculopatie mostrano una relazione con l'Alzheimer [17]. Un altro fattore di rischio modificabile è un'igiene orale inadeguata che può portare all'insorgenza di malattie parodontali, in particolar modo della parodontite. Difatti, Kamer et al., nel 2015, mostrarono che gli individui non-AD con parodontite hanno un aumento del carico di amiloide nel cervello e la parodontite è stata recentemente definita come un fattore

di rischio per lo sviluppo di AD. Questa correlazione sarà il principale oggetto di ricerca bibliografica che verrà trattata più approfonditamente di seguito [25].

Ritroviamo, infine, come altri fattori di rischio la qualità del sonno, gli inquinanti ambientali, i metalli pesanti [26]. Riducendo i fattori di rischio modificabili, svolgendo interventi di prevenzione primaria intercettando le persone a rischio di sviluppare l'Alzheimer e/o altri tipi di demenza nelle fasi iniziali, è possibile ritardare o diminuire l'insorgenza della patologia nella popolazione. Recentemente è stato dimostrato che il rischio di sviluppare demenza è fortemente associato con la durata e l'esposizione alla fibrillazione atriale nelle persone di mezza età [27].

I fattori di rischio non modificabili sono rappresentati principalmente dall'età e dalla genetica: all'età, si può constatare che le persone più colpite presentano un'età superiore ai sessantacinque anni, oltre la quale, l'incidenza di malattia aumenta in modo esponenziale fino a circa ottanta anni; la genetica gioca un ruolo altrettanto importante nello sviluppo della malattia di Alzheimer, anche se sono più comuni le forme sporadiche di quelle familiari.

Le forme familiari, si manifestano in due o più persone appartenenti allo stesso nucleo familiare. Queste ultime possono essere causate da una mutazione genetica dei geni presenilina-1 (PSEN1), presenilina-2 (PSEN2) e proteina precursore di beta-amiloide (APP) che può essere trasmessa dal genitore al figlio con una probabilità del 50%.

Un altro fattore genetico di rischio nella patologia, è legato al gene APOE, più precisamente alla variante APOE-4. Chi eredita una sola copia di APOE-4 (o dal padre o dalla madre) ha un rischio da due a tre volte superiore di sviluppare la malattia rispetto a chi non eredita alcuna copia di APOE-4. Chi eredita due copie di APOE-4 (una dal padre e una dalla madre), ha un rischio da otto a diciotto volte superiore di sviluppare la malattia rispetto a chi non lo eredita. Tuttavia, non è assolutamente certo che chi ha ereditato il gene APOE-4 svilupperà sicuramente

la malattia di Alzheimer e nemmeno chi ha già la patologia conclamata ha sempre la presenza di questo tipo di gene [17].

### 3.4 Prevenzione e cura

Studi osservazionali hanno definito diversi fattori di rischio modificabili per la malattia di Alzheimer (AD) su cui intervenire come prevenzione primaria. Poiché l'AD si sviluppa su una lunga fase preclinica che può durare per diversi decenni, è importante valutare i fattori di rischio in tarda età o poco prima dell'inizio dei sintomi clinici, per rallentare lo sviluppo di AD. È stato stimato che fino a un terzo dei casi di AD sono attribuiti a questi fattori e, di conseguenza, potrebbero essere prevenuti. Attualmente, non esiste un trattamento farmacologico promettente per prevenire il rischio di sviluppo di AD o modificarne i progressi. Pertanto, i risultati emergenti da studi preclinici e clinici evidenziano che intervenire sui fattori di rischio modificabili, quindi sulle abitudini alimentari e sullo stile di vita, può essere un efficace trattamento preventivo e anche terapeutico dell'AD [28].

Riguardo al trattamento farmacologico dell'AD, ad oggi, ci sono pochi farmaci approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). È stato dimostrato che l'acetilcolina (ACh) è altamente correlata con la funzione della memoria, inclusa la codifica della memoria, l'immagazzinamento di consolidamento e il processo di recupero. Attualmente, almeno tre inibitori della colinesterasi (AChEI) approvati dalla FDA statunitense vengono utilizzati per trattare l'AD, ma possono solo migliorare i sintomi cognitivi dell'AD per un certo periodo ma non possono modificare il decorso della malattia [29]. Un'altra opzione di trattamento include l'immunizzazione attiva e passiva, farmaci antiaggreganti, inibitori delle  $\gamma$  e delle  $\beta$ -secretasi.

Intervenire sulle abitudini alimentari significherebbe ridurre al minimo l'assunzione di grassi trans e saturi, latticini, aumentare il consumo di verdura, frutta, legumi (fagioli, piselli e

lenticchie) e cereali integrali. Inoltre, vengono suggeriti vari modelli dietetici per ridurre i segni neuropatologici dell'AD, tra cui dieta chetogenica (KD), restrizione calorica (CR), dieta mediterranea (MedDi), Approcci dietetici per fermare l'ipertensione (DASH) e Mediterranean-DASH Intervento dietetico per il ritardo neurologico (MIND) [30].

Un altro approccio per prevenire l'AD, è promuovere l'attività fisica. Studi recenti hanno dimostrato come l'attività fisica (AF) può contribuire a ritardare l'invecchiamento cerebrale e patologie degenerative come il morbo di Alzheimer, il diabete e la sclerosi multipla. Ancora più importante, l'AF migliora i processi cognitivi e la memoria, ha effetti analgesici e antidepressivi e induce persino un senso di benessere, *mens sana in corpore sano* [31].

Il Dipartimento della salute e dei servizi umani (HHS) degli Stati Uniti nel 2018, ha indicato come l'AF agisca sulla salute del cervello umano a qualsiasi età. Infatti tra i fattori eziologici nel processo patogenetico dell'AD, oltre alla formazione delle placche amiloide e grovigli neurofibrillari, possono essere implicati anche la resistenza all'insulina e l'ipometabolismo del glucosio (tanto che l'AD è stato definito da taluni diabete di III tipo), la neuroinfiammazione e lo stress ossidativo, tutti processi che vengono rallentati o inibiti dall'attività fisica. È stato inoltre dimostrato che l'esercizio riduce l'accumulo di A $\beta$  inibendo l'attività di BACE-1 (Beta-secretasi 1), proteasi dell'acido aspartico [32].

Un altro fattore su cui prevenire è il diabete. L'insulina alterata o la segnalazione correlata all'insulina sembra essere coinvolta in molte delle patologie del cervello di AD. L'insulina può anche essere trasportata attivamente dalla periferia al cervello attraverso la barriera ematoencefalica (BBB). Questo trasporto può essere modulato da molteplici fattori come ormoni, digiuno, obesità o altre condizioni come l'invecchiamento e il diabete. Il controllo delle complicanze diabetiche ha un effetto significativo sulla durata della vita, sulla riduzione delle

placche A $\beta$  e sulla funzione cognitiva. Diversi studi hanno dimostrato che i pazienti con diagnosi di diabete mellito di tipo 2 (T2DM) sviluppano più velocemente AD [33].

Pertanto, la malattia di Alzheimer non ha ancora una cura specifica che possa arrestare la progressione della patologia, ma la letteratura consiglia di andare a rintracciare tutti i fattori di rischio modificabili, svolgendo una curata prevenzione primaria e secondaria.

## 4. Associazione tra microbioma, parodontite e AD

### 4.1 La salute orale e la funzione cognitiva

Recenti studi preclinici ed epidemiologici hanno mostrato un'interconnessione tra salute orale e salute del cervello [34].

La salute orale è un importante indice di benessere, in quanto in assenza di essa, si possono avere problemi legati a dolore, infezioni, xerostomia, deglutizione, difficoltà nella comunicazione e socializzazione. In particolare, esiste un'associazione di alcuni parametri di cattiva salute orale, quali la perdita dei denti e la difficoltà masticatoria, con il declino cognitivo: nei soggetti con una masticazione ridotta, si associa un livello cognitivo inferiore e la stessa rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza della demenza o di una lieve compromissione della memoria [35]. La relazione tra il numero dei denti e la funzione cognitiva è stata ampiamente confermata in più studi indipendenti. Uno di questi studi, *The Shanghai Aging Study*, prospettico di coorte su 3.000 adulti cinesi di età pari o superiore a 60 anni, ha riportato un numero inferiore di denti e un aumento della colonizzazione dei batteri parodontali negli individui con demenza rispetto a quelli con decadimento cognitivo lieve e salute cognitiva normale [36]. Un altro recente studio di morfometria alla risonanza magnetica su soggetti non dementi dentati ed edentuli, ha registrato un'atrofia della materia grigia nell'ippocampo, nel nucleo caudato e nel polo temporale dell'emisfero destro in soggetti umani edentuli rispetto ai dentati, suggerendo che la perdita dei denti aumenta i rischi di atrofia delle aree cerebrali correlate alla memoria, all'apprendimento e alla cognizione [37]. Altri ampi studi clinici di coorte hanno però valutato che la funzione cognitiva può essere migliorata se, la masticazione in soggetti che hanno perso diversi elementi dentali, viene ripristinata [38].

Tuttavia, il peggioramento della funzione cognitiva determina a sua volta, un'alterazione della salute orale. Difatti gli individui con demenza hanno difficoltà a praticare l'igiene orale, hanno

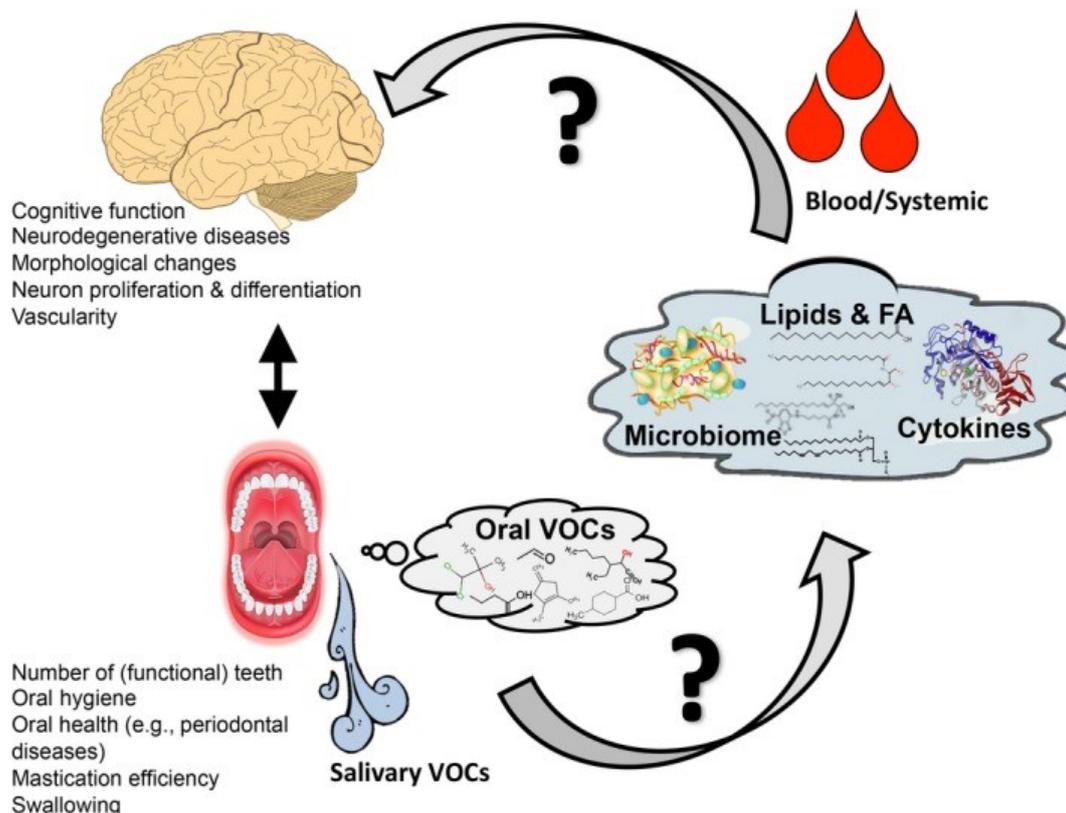
risorse ridotte e ricevono meno cure odontoiatriche rispetto alla popolazione in generale. Altri studi scientifici hanno dimostrato come la demenza sia un forte fattore predittivo di cattiva salute orale, inclusa la gravità della parodontite. Vi è dunque un'associazione bidirezionale tra salute orale e demenza [34] e diversi biomarcatori orali, che verranno illustrati nel paragrafo successivo, possono essere utilizzati come strumenti diagnostici per l'AD.

#### 4.1.1 I biomarcatori orali per la diagnosi della malattia di Alzheimer

Diversi studi sperimentali e clinici, indicano una possibile interconnessione tra elementi biologici presenti nel cavo orale (composti organici volatili, proteine e lipidi individuati mediante proteomica e lipidomica salivare, microbioma), salute orale e declino cognitivo.

Questi potenziali biomarcatori orali possono risultare utili per eseguire una diagnosi di AD.

Nelle pagine seguenti verrà descritta la relazione patogenetica tra il microbiota orale, la parodontite e specifici batteri parodontopatogeni e la malattia di Alzheimer [34] (Fig.4).



*Figura 4. Interazione schematica della salute orale e della funzione cognitiva cerebrale e possibili meccanismi che le collegano. [34]*

#### 4.1.1.1 Composti organici volatili (COV)

I composti organici volatili (COV) sono sostanze chimiche organiche che producono rapidamente vapori a temperatura ambiente, emessi come gas da determinati solidi o liquidi. Tutti i composti organici contengono carbonio e le sostanze chimiche organiche sono di base presenti in tutti gli esseri viventi. Oggigiorno, molti composti organici presenti nell'aria derivano dai processi industriali o dalla combustione determinata dall'uomo. Le fonti di COV includono benzina, prodotti chimici industriali (benzene), solventi (toluene e xilene) e percloroetilene (principale solvente per lavaggio a secco). I COV vengono rilasciati anche dalla combustione di carburante, come benzina, legno, carbone, gas naturale e da solventi, vernici, colle e altri prodotti utilizzati a casa o al lavoro. Pertanto i COV includono una molteplicità di

sostanze chimiche, alcune delle quali possono comportare dei rischi per la salute umana sia nel breve che nel lungo termine [39] poiché riescono a diffondere facilmente attraverso la fase gassosa e all'interno dei sistemi biologici, grazie al loro basso peso molecolare (~ 500 Dalton), ai bassi punti di ebollizione e all'alta pressione del vapore in condizioni ambientali [34]. Migliaia di COV vengono escreti in ogni respiro e si sono dimostrati utili per diagnosticare un'ampia gamma di malattie, incluso il diabete [40], le malattie gastrointestinali ed epatiche [41], diversi tipi di cancro [42, 43] e le infezioni [44].

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha voluto utilizzare i COV nella diagnosi delle malattie neurodegenerative, tra cui la malattia di Alzheimer [34]. Mazzatenta et al. nel loro studio hanno proposto l'analisi dei COV espirati come promettente strumento diagnostico e di screening dell'AD. I COV espirati rispecchiano il metabolismo, anche neuronale, in condizioni di salute e di malattia. In questo stesso studio, inoltre, hanno dimostrato che i pazienti con AD mostravano una differenza significativa nella frequenza del respiro ( $p=0,002$ ) e nella frequenza massima del picco del respiro ( $p=0,02$ ) rispetto ai soggetti sani, probabilmente a causa di un aumento della morte o del danno neuronale [45]. I cambiamenti nella respirazione, insieme alla presenza dei COV, possono diventare utili nella prevenzione e nella diagnosi dell'AD [34].

#### 4.1.1.2 Proteomica e lipidomica salivare

Per la diagnosi ed il monitoraggio di alcune patologie, la saliva può essere un ottimo strumento alternativo al sangue o ad altri fluidi corporei. Il fluido orale è facilmente ottenibile attraverso delle procedure non invasive e contiene un gran numero di analiti trasferiti dal siero come le citochine, gli anticorpi, gli ormoni, i COV e i farmaci. L'analisi proteomica e trascrittomica salivare trova attualmente applicazione nelle indagini di biomarcatori, nel cancro orale e nelle malattie parodontali [34].

Riguardo alle malattie neurodegenerative, Farah et al. hanno esaminato recentemente i loro potenziali biomarcatori salivari. Il cambiamento dei livelli di proteine salivari, come i peptidi A $\beta$  (A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42), la tau e la lattoferrina e l'attività dell'acetilcolinesterasi salivare, sono stati collegati all'AD [46].

Gli studi di lipidomica salivare (i lipidi presenti nella saliva sono i lipidi neutri come il colesterolo, esteri del colesterolo, monogliceridi, digliceridi, trigliceridi e acidi grassi liberi) che valutano i lipidi salivari come marker per la salute orale o per il declino cognitivo, sono ancora pochi. Tuttavia si ritiene che la lipidomica salivare in condizioni neurodegenerative o di declino cognitivo, potrebbe essere utile nelle diagnosi di malattia neurologica inclusa l'AD, sebbene siano necessari ulteriori studi per confermare l'ipotesi [34].

#### 4.1.1.3 Microbioma orale

L'ultimo biomarcatore orale per la diagnosi dell'AD è il microbioma orale.

Il microbioma orale, come quello intestinale, svolge un ruolo importante nel metabolismo degli acidi grassi a catena corta, degli acidi organici, delle vitamine e anche nella trasformazione dei sali biliari, dei lipidi e degli amminoacidi. Pertanto, quando si verifica la disbiosi, ovvero il cambiamento del microbiota umano, si ha un'alterazione della salute nell'individuo.

Molti studi scientifici si sono concentrati sulla correlazione tra la disbiosi intestinale con l'AD. Probabilmente, il ruolo del microbioma intestinale nella patogenesi dell'AD deriva dall'asse intestino-cervello, una via di comunicazione bidirezionale tra il sistema nervoso enterico e centrale. Gli studi condotti sui topi, hanno osservato che la disbiosi intestinale può causare una maggiore espressione della proteina precursore dell'amiloide e aumentare il rischio di neuroinfiammazione [34]. Recentemente diversi ricercatori hanno trovato anche una forte correlazione tra l'alterazione del profilo microbico del cavo orale con l'AD, con particolare

riguardo alla parodontite [26]. Se in passato la disbiosi del microbioma orale era associata prevalentemente a malattie orali tra cui la carie dentale e la parodontite, oggi possiamo confermare la sua forte relazione con varie malattie tra cui l'AD [34].

I meccanismi con cui il microbiota orale influisce sulla malattia di Alzheimer o sul declino cognitivo sono molteplici e vengono analizzati in dettaglio nelle pagine seguenti.

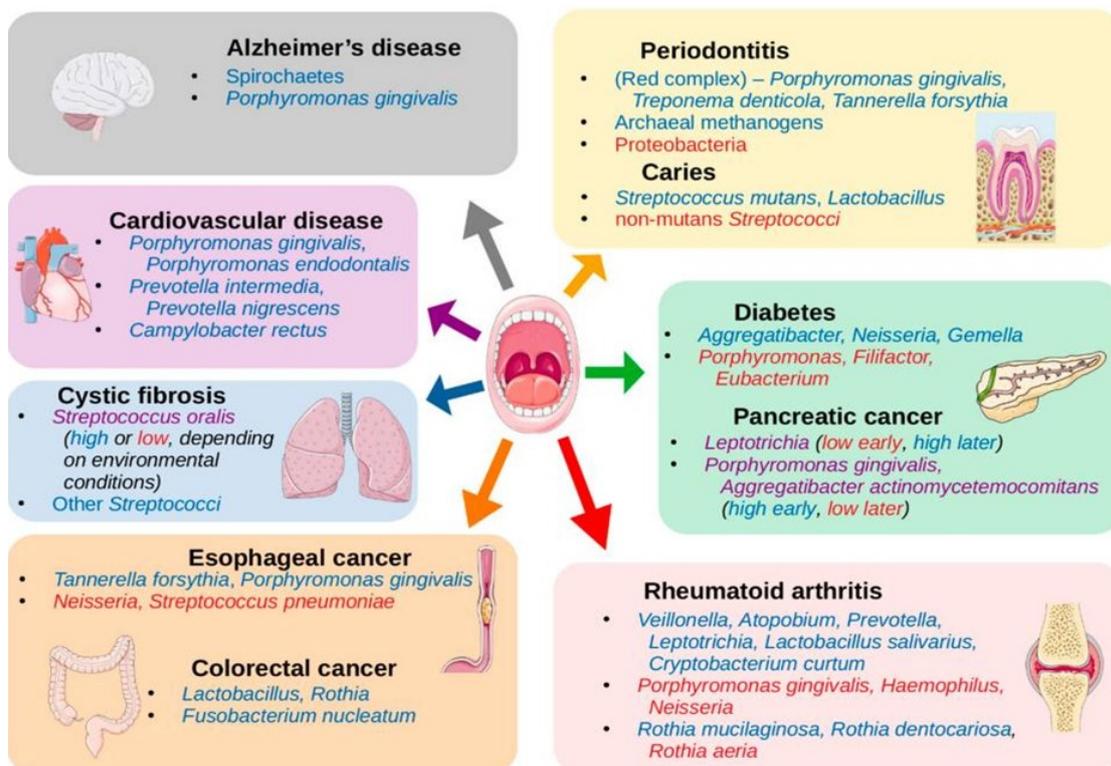
## 4.2 Il ruolo del microbioma orale nelle patologie orali e sistemiche

Il termine *microbioma* è stato coniato da Joshua Lederberg per indicare la "*comunità ecologica di microrganismi commensali, simbiotici e patogeni che condividono il nostro spazio corporeo*" [47]. Ciò di cui tratteremo è il microbioma della cavità orale, un ecosistema formato oltre che dai microrganismi anche da diversi habitat: le superfici epiteliali delle mucose quali le labbra, la lingua, le tonsille, il palato, la gengiva, gli spazi subgengivali e le superfici dure dei denti.

Ogni giorno il microbiota orale subisce cambiamenti ambientali dovuti all'alimentazione, all'utilizzo di antimicrobici, al consumo di tabacco, l'adozione di misure igieniche specifiche e fluttuazioni in pH [26]. Le superfici della cavità orale, sono esposte costantemente al fluido salivare o, se sottogengivale, al fluido crevicolare gengivale (GCF) [48]. Il microbiota orale viene definito come uno delle comunità microbiche più diversificate e abbondanti presenti nell'organismo umano. La bocca, effettivamente, ospita oltre 700 taxa batterici e la maggior parte di essi risiedono nell'ambiente anaerobico della superficie sottogengivale nel quale costituiscono la placca dentale [25].

I colonizzatori primari delle superfici orali sono soprattutto anaerobi facoltativi come streptococchi e *Actinomyces*. A livello sottogengivale, la ridotta disponibilità dell'ossigeno, determina un cambiamento della popolazione microbica in anaerobi stretti come *Bacteroidaceae* spp. e spirochete. I microrganismi sulle superfici dentali tendono a formare

comunità di biofilm multispecie, spesso avvolte in una matrice di sostanze polimeriche extracellulari (EPS). Al contrario, sulle superfici epiteliali, la formazione di biofilm da parte dei microrganismi richiede una strategia di colonizzazione specializzata in quanto c'è meno tempo per la maturazione del biofilm rispetto alle superfici dentali [48]. Attraverso le manovre di igiene orale domiciliare e professionale, è possibile rimuovere il biofilm sopra e sottogengivale per prevenire le malattie parodontali (gingivite e parodontite) e la carie dentale. Oltre a questo, la rimozione di biofilm può essere causa di batteriemia anche solo attraverso procedure di spazzolamento quotidiano o durante l'utilizzo di specifici strumenti da parte del professionista. Solitamente questa batteriemia è transitoria e i batteri vengono eliminati velocemente dal sangue ma può capitare in alcuni individui, principalmente immunosoppressi o anziani, che i microbi orali colonizzano in siti distanti nel corpo come cuore e anche cervello dando origine a delle patologie sistemiche [25] (Fig.5).



**Figura 5.** Malattie orali e sistemiche associate al microbioma orale. È stato dimostrato che i microrganismi elencati in blu sono aumentati in abbondanza nella cavità orale negli individui che presentano la malattia indicata; gli organismi elencati in rosso hanno dimostrato di essere diminuiti. Quelli in viola possono aumentare o diminuire a seconda della condizione o progressione della malattia [49].

La bocca è l'inizio del tratto gastrointestinale e del sistema respiratorio e l'elevata vascolarizzazione favorisce il ruolo del microbioma orale in altre malattie sistemiche come il diabete, l'artrite reumatoide, la fibrosi cistica, patologie cardiovascolari, cancro esofageo e coloretale ed infine la malattia di Alzheimer [49].

Di seguito verranno trattate le patologie orali e sistemiche correlate alla disbiosi orale.

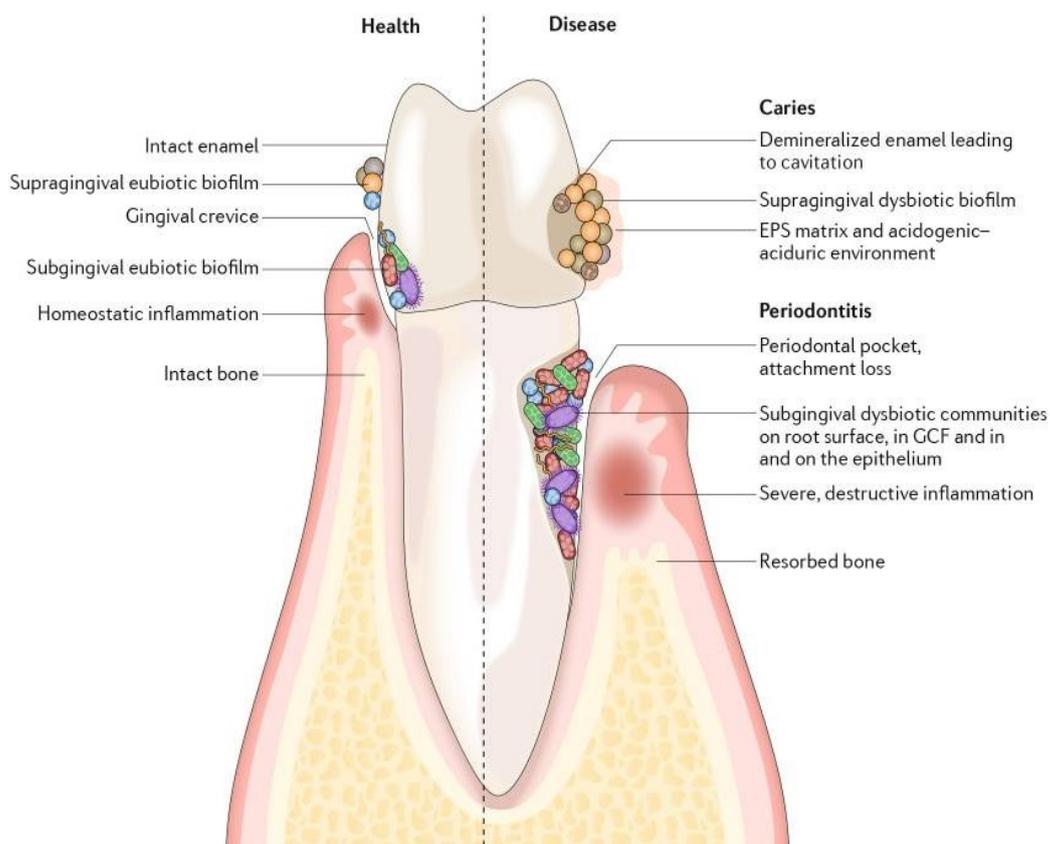
#### 4.2.1 Patologie orali correlate alla disbiosi orale

I processi responsabili del passaggio di una comunità microbica sana ad uno stato di disbiosi nel cavo orale sono molteplici [48]. Quando si parla di disbiosi orale ci si riferisce ad uno squilibrio microbico in cui si assiste ad un aumento dei livelli dei batteri nocivi e una riduzione dei batteri benefici [50]. Pertanto, i processi che possono portare al passaggio del microbiota orale ad uno stato di disbiosi, sono influenzati dalle alterazioni della risposta immunitaria dell'ospite o dai cambiamenti delle abitudini alimentari. Questi cambiamenti influenzano la composizione della comunità microbica della cavità orale determinandone la disbiosi [48]. I batteri associati alla salute parodontale comprendono *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Prevotella* e *Capnocytophaga*.

La placca dentale (o biofilm) si forma sulla superficie dentale a seguito dello sviluppo della pellicola acquisita che promuove l'adesione batterica. I primi colonizzatori sono *Streptococcus* e *Actinomyces* che favoriscono la formazione di un biofilm multispecie caratterizzato dalla coaggregazione tra taxa batterici. Mentre, il biofilm sottogengivale è tipicamente più anaerobico rispetto al biofilm sopragengivale [51].

Il microbiota associato alla malattia è costituito prevalentemente da microrganismi "specialistici" che possiedono funzioni metaboliche che più si adattano ai cambiamenti che si

verificano nella fessura gengivale e con un potenziale più elevato di virulenza quale il *Porphyromonas gingivalis* aiutato da agenti patogeni accessori (ad esempio, *Streptococcus gordonii*). Questi stessi promuovono infiammazione. L'infiammazione peggiora la disbiosi aumentando il flusso del fluido crevicolare gengivale (GCF) che trasporta collagene degradato e composti contenenti eme nella fessura gengivale, dove si sviluppano comunità disbiotiche. Al contrario, le specie associate alla salute (eubiotiche) non possono trarre vantaggio dalle nuove condizioni ambientali. Questo squilibrio guida la disbiosi, che esacerba ulteriormente l'infiammazione, culminando nella parodontite negli individui predisposti. Una volta che una comunità è passata a uno stato disbiotico, può determinare l'insorgenza di malattie orali come la parodontite e la carie dentale [48] (Fig.6)



**Figura 6.** Microbioma orale e la sua disbiosi. In salute (a sinistra), i biofilm eubiotici mantengono un equilibrio omeostatico con l'ospite. Nella malattia (a destra), la carie e la parodontite si verificano quando i biofilm diventano disbiotici, con conseguente aumento dei livelli e della durata della stimolazione a pH basso e nell'induzione di risposte infiammatorie distruttive, rispettivamente. EPS, sostanza polimerica extracellulare; GCF, fluido crevicolare gengivale [48].

#### 4.2.1.1 La carie dentale

La carie o lesione cariosa è una malattia infettiva cronica-degenerativa a carattere multifattoriale [52]. Il termine carie “dentale” è stato riportato per la prima volta in letteratura intorno al 1634 e origina dalla parola latina “*caries*” che significa *decadimento*. È una delle patologie più comuni presenti negli esseri umani e deriva principalmente da batteri specifici aderenti ai denti che metabolizzano gli zuccheri per produrre acidi causandone la demineralizzazione dei tessuti duri del dente (smalto e dentina). Il batterio maggiormente responsabile della lesione cariosa è lo *Streptococcus mutans*<sup>1</sup>, presente nelle prime fasi del processo carioso. Altri microrganismi importanti sono i *Lactobacillus*<sup>2</sup>, presenti nella progressione della carie dentale [53]. La carie ha un’eziologia multifattoriale perché è causata da tre fattori principali: dieta, placca dentale e suscettibilità dell’ospite. Recentemente è stato aggiunto un altro fattore, ovvero il “tempo”, che descrive la durata dell’interazione dei tre fattori descritti sopra. Difatti, la sovraesposizione ai carboidrati nella dieta e la diversa suscettibilità dell’ospite, favoriscono la produzione di una matrice di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) e metaboliti acidi che provocano l’accumulo di microrganismi acidogeni e acidurici. L’eccesso di carboidrati fermentabili, genera un cambiamento del microbiota orale inducendone una disbiosi. Se quotidianamente assumiamo un’elevata e frequente quantità di carboidrati fermentabili, i microrganismi si aggregano in una matrice di biofilm ricca di EPS, i quali produrrebbero costantemente acidi che sono fisicamente protetti dal tamponamento rapido della saliva. Le diverse regioni caratterizzate da un pH basso, presenti all’interno dei biofilm formati sulle superfici dei denti, continuano a selezionare i microrganismi acidurici. Se il biofilm non

---

<sup>1</sup> Batterio Gram-positivo anaerobio facoltativo descritto per la prima volta da Clarke nel 1924. È il principale batterio coinvolto nel metabolismo del saccarosio, lo zucchero più cariogeno per l’uomo in quanto viene ridotto in acido lattico [54].

<sup>2</sup> Batteri Gram-positivi anaerobi facoltativi o microaerofili di forma bastoncellare. Fanno parte del gruppo dei batteri lattici perché convertono il lattosio e altri zuccheri in acido lattico attraverso la fermentazione lattica [55].

viene rimosso attraverso le manovre di igiene orale domiciliare e professionale e non si interviene sul consumo frequente di zucchero, tutto ciò comporterebbe uno stato di acidificazione prolungato e ripetuto (che può essere esacerbato da disfunzioni nella secrezione o composizione salivare), interrompendo l'equilibrio minerale omeostatico, causando infine la demineralizzazione dello smalto.

I patogeni associati alle carie non comprendono solo lo *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, difatti analisi molecolari più recenti hanno dedotto l'esistenza di comunità microbiche patogene che ne includono come *Propionobacterium*, *Bifidobacterium* spp., *Scardovia* spp e *Actinomyces* ed infine funghi come la *Candida albicans*. La composizione microbica varia in diverse superfici dentali e questi microrganismi interagiscono tra loro formando un biofilm cariogeno (cioè un biofilm che può causare carie) all'interno del quale la comunità cambia mano a mano che la carie progredisce dall'esordio precoce (demineralizzazione iniziale) alle lesioni più profonde che coinvolgono la dentina [48].

#### 4.2.1.2 La malattia parodontale

Le malattie parodontali, gengivite e parodontite, derivano principalmente da infezioni opportunistiche. I fattori predominanti che portano a cambiamenti nei batteri che causano malattie parodontali sono tuttora sconosciuti, sebbene sia riconosciuto che un'odontoiatria iatrogena (ad esempio restauri o protesi incongrue), le condizioni genetiche che alterano la risposta dell'ospite e le malattie sistemiche, predispongono alla malattia [51]. Nelle malattie parodontali, le comunità polimicrobiche inducono una risposta dell'ospite esagerata e distruttiva attraverso un meccanismo globale denominato sinergia polimicrobica e disbiosi. Difatti quando parliamo di gengivite e parodontite, la tesi più probabile è che si verifichi un'alterazione della composizione microbica o della patogenicità batterica che viene attualmente definita disbiosi

microbica. Inoltre, la composizione e l'abbondanza delle singole specie microbiche, cambia da salute a malattia. Pertanto, quando siamo in una condizione di disbiosi orale, si verifica la comparsa di specie dominanti, piuttosto che la presenza di nuove specie, come ad esempio la presenza dei patogeni esogeni assenti in salute. Tuttavia le comunità polimicrobiche associate alla malattia si trovano anche nella salute ma in abbondanza relativamente ridotta [48].

Nella parodontite, la presenza delle specie microbiche responsabili dell'inizio e della progressione della malattia, si trovano anche nei soggetti sani ma in numero ridotto. I microrganismi correlati alla parodontite vengono definiti storicamente come microrganismi del "complesso rosso" da Sigmund Socransky e comprendono *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (ex *Bacteroides forsythus*) e *Treponema denticola* [56].

Il cambiamento nella struttura e composizione della comunità microbica dà inizio allo stato di malattia, determinando un aumento dei microrganismi a livello quantitativo e un cambiamento qualitativo associato alla competitività tra le specie, portando ad un aumento dei taxa batterici. Socransky e colleghi (1998) avevano identificato combinazioni di *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* come altamente associate a parodontite. Fine e collaboratori (2013) hanno riferito che una combinazione di *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis* e *Filifactor alocis* era associata a perdita ossea nella parodontite aggressiva localizzata [51]. Pertanto, la colonizzazione da parte dei microrganismi parodontopatogeni, innesca una difesa innata dell'ospite alterata, promuovendone l'infiammazione [48]. L'infiammazione è un processo di difesa dell'organismo nei confronti di invasori patogeni; tuttavia, una volta superata la minaccia, il processo infiammatorio dovrebbe passare alla fase di risoluzione. La mancata risoluzione di questo processo, causa un'infiammazione prolungata e cronica e si ritiene che la parodontite sia il risultato di una mancata risoluzione [57].

In questa situazione di infiammazione cronica si osserva la crescita di microrganismi parodontopatogeni che causano la distruzione dei tessuti e rilasciano sostanze nutritive (ad esempio, collagene degradato, composti contenenti EME, fonti di aminoacidi e ferro) essenziali per favorire la crescita di altri batteri proteolitici e asaccarolitici sottogengivali. Questi nutrienti possono essere trasportati attraverso l'essudato infiammatorio nella fessura gengivale.

È ancora oggetto di dibattito se la disbiosi sia una causa o una conseguenza di una malattia infiammatoria. Nella parodontite sembra esserci una relazione reciproca di causa ed effetto tra disbiosi e infiammazione [48].

#### 4.2.2 Patologie sistemiche correlate alla disbiosi orale

La disbiosi del microbiota orale interferisce non solo sulle patologie orali, ma anche sulle malattie sistemiche. Come affermato precedentemente, c'è un forte legame tra disbiosi e infiammazione orale e la letteratura sottolinea che questi due processi contribuiscono ad alterare la salute sistemica attraverso la batteriemia. Difatti la cavità orale è il primo punto di accesso al tratto digerente e respiratorio. Dunque, le numerose malattie sistemiche influenzate dalla disbiosi microbica sono: malattie del sistema gastrointestinale (malattie infiammatorie intestinali, cirrosi epatica, cancro del pancreas), malattie del sistema nervoso (il morbo di Alzheimer), malattie del sistema endocrino (il diabete, esiti avversi della gravidanza, obesità e sindrome dell'ovaio policistico), malattie del sistema immunitario (l'artrite reumatoide e l'infezione da HIV) ed infine malattie del sistema cardiovascolare (l'aterosclerosi) [58].

Di seguito verrà riportata la correlazione tra disbiosi orale e le varie patologie sistemiche, con particolare riferimento alla malattia di Alzheimer.

*Malattie del sistema cardiovascolare.* Il legame tra disbiosi orale e malattie del sistema cardiovascolare non è ancora ben chiaro sebbene alcuni ricercatori hanno dimostrato una relazione tra aterosclerosi e microbioma orale [58].

L'aterosclerosi è una patologia cronica e progressiva che colpisce i vasi sanguigni e a causa dell'ispessimento e della perdita di elasticità delle arterie, si assiste ad una riduzione del flusso sanguigno nelle restanti aree del corpo irrorate dall'arteria colpita. L'aterosclerosi insorge principalmente in età adulta o avanzata anche se è possibile individuare i primi segni nell'infanzia dovuti alla presenza delle strie lipidiche.

Il restringimento delle arterie è dovuto soprattutto alla formazione di placche aterosclerotiche (o ateromi) causate dal deposito di grasso (colesterolo e fosfolipidi) che viene fagocitato sottoforma di LDL perlopiù ossidate dai macrofagi residenti al di sotto dell'intima; la sua evoluzione può portare alla riduzione della dimensione interna dell'arteria (lume), alla sua ulcerazione con formazione di coaguli (trombi) e, nei casi più gravi, alla sua occlusione [59].

Attraverso il sequenziamento dell'rRNA 16S<sup>3</sup>, Koren et al. hanno identificato *Chryseomonas*, *Veillonella* e *Streptococcus* nella maggior parte dei microbiomi orali dei pazienti aterosclerotici. Più dettagliatamente, i membri batterici chiave della placca dentale sono stati rilevati nelle placche aterosclerotiche di essere umani. Questi risultati suggeriscono che la cavità orale ma anche l'intestino possono essere fonti di batteri associati anche alla placca aterosclerotica. Inoltre, i microrganismi appartenenti al microbiota orale e intestinale sono correlati ai biomarcatori dell'aterosclerosi, in particolare al colesterolo plasmatico. Perciò, partendo da questi risultati, altri studi dovranno indagare se la composizione della comunità

---

<sup>3</sup> L'RNA ribosomiale 16 S (o rRNA 16S) è il componente della piccola subunità 30S di un ribosoma procariotico che si lega alla sequenza di Shine-Dalgarno (sito di legame ribosomiale). I geni che lo codificano sono indicati come gene rRNA 16S e vengono utilizzati nella ricostruzione delle filogenesi. Il gene 16S rRNA viene utilizzato per studi filogenetici poiché è altamente conservato tra diverse specie di batteri e archei. Carl Woese ha aperto la strada a questo uso dell'rRNA 16S [60].

batterica orale e/o fecale può predire l'aterosclerosi e in che modo i batteri specifici, come *Chryseomonas*, può contribuire allo sviluppo, alla progressione dell'aterosclerosi [61].

*Malattie del sistema immunitario.* I microbiomi orali sono notevolmente correlati alle malattie del sistema immunitario umano come ad esempio l'artrite reumatoide (RA), il lupus eritematoso sistemico (LES), la sindrome da anti - fosfolipidi (APS), la sindrome di Sjögren (SS), la sclerosi sistemica (SSC), ed influenzano inoltre la funzione del sistema immunitario nei confronti di infezioni come l'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV).

La disbiosi del microbioma può essere un fattore di rischio per malattie autoimmuni in persone con determinati background genetici e fattori ambientali. La disbiosi può essere classificata in tre diversi tipi: (1) perdita di microrganismi benefici, (2) crescita eccessiva di microrganismi potenzialmente dannosi e (3) perdita della diversità microbica complessiva. Inoltre, diversi commensali possono aumentare o diminuire di quantità a seconda della malattia: nella SM (sclerosi multipla), diminuisce *Prevotella*, mentre nella RA aumenta. Recentemente, gli studi si sono concentrati nel ridurre gli effetti negativi mediati dal microbiota durante lo stato di malattia. Tuttavia è possibile ripristinare la flora sana attraverso la somministrazione di probiotici, batteri Gram-positivi (es. *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. e altri ceppi non patogeni di *E. coli*), trapianto di microbiota fecale (FMT), che consiste nell'innestare un microbiota sano nei pazienti che hanno necessità di reintrodurre o ristabilire un ambiente stabile che influenza sia i microbi endogeni che l'ospite [62].

*Malattie del sistema endocrino.* Diverse ricerche hanno dimostrato che le malattie del sistema endocrino quali principalmente il diabete, gli esiti avversi della gravidanza (APO) e l'obesità sono in parte associati ai microbiomi orali.

Il diabete mellito è una patologia caratterizzata da iperglicemia, infiammazione e forte stress ossidativo che può indurre complicazioni sistemiche. Esiste una forte correlazione bidirezionale tra parodontite e diabete. Il diabete sia di tipo I che di tipo II, è un fattore di rischio per la parodontite e aumenta la gravità della malattia. Uno studio sull'associazione tra stato diabetico e condizioni parodontali in 1.342 individui, ha mostrato un aumento del rischio di parodontite. Difatti il diabete causa un cambiamento nella composizione batterica orale e Casarin et al. avevano osservato come il microbiota subgingivale di pazienti diabetici rispetto ai sani, era rappresentato da una percentuale più alta di *Aggregatibacter*, *Neisseria*, *Gemella*, *Eikenella*, *Selenomonas*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Streptococcus*, perciò molto più patogeno rispetto ai pazienti non diabetici.

Un'altra scoperta significativa è stata la correlazione tra APO e i cambiamenti del microbioma orale. Madianos et al. nel 2013 avevano scoperto che le madri APO avevano livelli notevolmente più alti di *Bacteroides forsythus* e *Campylobacter rectus*. Anche un altro batterio associato alla parodontite, il *Fusobacterium nucleatum*, è strettamente correlato agli APO e può essere trasmesso per via ematogena alla placenta causando parti prematuri. Quindi, la risposta infiammatoria sistemica suscitata può intensificare le risposte infiammatorie locali a livello dell'unità feto-placentare e aumentare ulteriormente il rischio di APO.

Un'altra patologia correlata al microbioma orale è l'obesità. Le persone in sovrappeso presentano un livello di infiammazione ampiamente riconosciuto e Goodson et al. avevano scoperto che la composizione dei batteri salivari cambia nelle donne in sovrappeso e pertanto i batteri orali possono partecipare alla patologia che porta all'obesità.

Infine, il microbioma sembrerebbe essere coinvolto anche nella sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), una condizione endocrina femminile con eziologia ancora oggi controversa ma causata da una complessa alterazione funzionale del sistema riproduttivo data dall'aumento degli ormoni maschili (androgeni) [63]. Le principali complicanze correlate a PCOS sono l'infertilità, l'obesità, la resistenza all'insulina e l'infiammazione di basso grado. È noto che il microbioma intestinale concorre a molte di queste condizioni di salute, ma studi recenti di Lindheim et al. del 2016 hanno mostrato una connessione tra i profili delle comunità del microbioma delle feci e della saliva. In particolare, in pazienti con PCOS si è evidenziata una riduzione dei batteri del phylum *Actinobacteria* e un cambiamento borderline nella composizione della comunità batterica [58].

*Malattie del sistema gastrointestinale.* È ormai noto che le malattie del sistema gastrointestinale quali la malattia infiammatoria cronica intestinale (MICI), la cirrosi epatica e i tumori gastrointestinali hanno una stretta correlazione con il microbiota orale [58].

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) quali la colite ulcerosa (CU) e la malattia di Crohn (MC), sono delle patologie caratterizzate da una persistente infiammazione cronica della parete intestinale che causano diarrea, dolore, debolezza e perdita di peso. La differenza tra le due patologie è che la CU viene definita come un'infiammazione continua, diffusa e superficiale del colon; la MC può colpire qualsiasi area del tubo gastrointestinale, dalla bocca all'ano anche se principalmente colpisce il colon e l'ileo terminale [64].

La MICI viene definita come il risultato di articolate interazioni tra fattori genetici, immunologici, microbiologici e ambientali e la colonizzazione intestinale da parte dei batteri della cavità orale si è dimostrata sempre più coinvolta in queste malattie infiammatorie.

Difatti si è notato che i pazienti affetti da queste malattie infiammatorie, evidenziano sintomi orali come stomatite aftosa, ulcera orale, secchezza delle fauci e piostomatite vegetale indicando una possibile associazione del microbiota orale con tali manifestazioni.

Uno studio interessante di Atarashi et al. del 2017, ha dimostrato che i ceppi di *Klebsiella* spp. del microbiota orale possono colonizzarsi nell'intestino e indurre intensamente un'infiammazione intestinale cronica. Questi ceppi di *Klebsiella* tendono a colonizzarsi quando si ha un microbiota intestinale disbiotico inducendo una MICI soprattutto nei pazienti geneticamente suscettibili. Un altro studio di Said et al. nel 2014, aveva osservato che i generi dominanti quali *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Veillonella* e *Gemella*, contribuivano, in gran parte, alla disbiosi osservata nel microbiota orale dei pazienti con MICI. Questo studio ha inoltre riportato che la disbiosi osservata era fortemente associata a una risposta infiammatoria elevata di diverse citochine con lisozima impoverito nella saliva dei pazienti con MICI, alcune delle quali mostravano una forte correlazione con l'abbondanza relativa di alcune specie batteriche. Ad esempio, esiste una forte correlazione tra i livelli di lisozima e IL-1 $\beta$  e l'abbondanza relativa di *Streptococcus*, *Prevotella*, *Haemophilus* e *Veillonella*. Sebbene l'intestino sviluppi fisiologicamente delle strategie per difendersi dalla colonizzazione di batteri non nativi e per controllare l'espansione dei patogeni che causano malattie, a volte tutto questo non basta per evitare l'insorgenza di MICI. Pertanto si ha bisogno di ulteriori ricerche sul microbioma orale di pazienti con MICI e soprattutto capire l'importanza che possono avere altri fattori sulla disbiosi microbica correlata con MICI come l'età, la dieta e i farmaci [58].

Oltre alle malattie infiammatorie croniche intestinali, possiamo avere la cirrosi epatica e i tumori gastrointestinali. La cirrosi epatica è una malattia degenerativa del fegato, causata da un'infiammazione cronica, che provoca alterazioni della struttura e delle funzioni [65]. Diversi

studi hanno evidenziato che nei pazienti con cirrosi epatica si ha un'invasione di specie batteriche di origine buccale che possono contribuire alla patologia.

Infine i tumori gastrointestinali, soprattutto il tumore al pancreas, aumentano negli individui con parodontite, condizione causata da batteri orali. Fan et al. nel 2016, ha osservato il rapporto del microbiota orale con il conseguente rischio di tumore al pancreas in un ampio studio caso-controllo innestato (NCC). Nella valutazione diretta del microbioma a base genomica in campioni orali, il trasporto dei patogeni orali di *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* è stato collegato ad un aumento del rischio di tumore al pancreas. Mentre, il genere *Leptotrichia* era associato a un ridotto rischio di sviluppare questo tumore. Inoltre, questi batteri orali possono servire come biomarcatori prontamente accessibili e non invasivi per individuare le persone che hanno un alto rischio di sviluppare il tumore al pancreas. Infine, è importante ed è possibile eseguire delle terapie profilattiche mirate per combattere i patogeni parodontali così che si possa ridurre il rischio di tumore al pancreas [58].

#### 4.2.3 La disbiosi orale e il meccanismo d'azione patogeno nell'AD

L'ultima correlazione che viene affrontata è quella fra le malattie del sistema nervoso e il microbiota orale. Tra queste, la malattia di Alzheimer è oggetto di intensi studi.

Come abbiamo già descritto dettagliatamente nel capitolo dedicato, l'AD è l'esempio più comune di demenza, caratterizzata da deficit cognitivo e con un'eziologia complessa e multifattoriale. Diversi studiosi hanno evidenziato che diversi batteri che normalmente colonizzano il cavo orale, sono presenti nei pazienti con AD. Miklosy et al. già nel 1993, avevano dimostrato la presenza di diversi tipi di spirochete sia orali che intestinali, nei pazienti con diagnosi di AD. Più avanti, nel 2002, Riviere et al., avevano trovato anaerobi orali (phyla *Treponema*) in campioni di cervello mediante tecnologia PCR e anticorpi specie-specifici.

Inoltre è stato dimostrato che alcuni phyla batterici sono più strettamente associati all'AD, poiché non sono così fortemente rappresentati nei campioni non-AD. Ciò è coerente con lo studio di Poole et al. nel 2013, che aveva evidenziato la presenza del lipopolisaccaride dell'anaerobio orale *Porphyromonas gingivalis* nel cervello di pazienti con AD e non di controllo.

In un altro studio affascinante del 2009 di Kamer et al., hanno studiato l'associazione tra l'aumento del TNF $\alpha$  (fattore di necrosi tumorale – alfa) e l'AD. Attraverso la tecnica ELISA, avevano valutato che i livelli circolanti del TNF $\alpha$  e degli anticorpi per i batteri orali tra cui *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* sono risultati più alti nel siero dei pazienti con AD rispetto ai sani. Inoltre, uno studio longitudinale ha esplorato la possibilità di utilizzare i batteri orali come strumento predittivo nella diagnosi di AD. Questo studio prevedeva 158 persone tutte cognitivamente normali al tempo baseline e provenienti da adulti biologicamente resilienti nel programma di ricerca di studi neurologici presso l'Università del Kentuck. L'aumento al tempo baseline dei livelli di anticorpi specifici per gli anaerobi orali *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*, erano correlati ad un deficit cognitivo che presumibilmente sarebbe avvenuto nei soggetti circa 10 anni dopo [58].

Pertanto c'è una forte associazione tra disbiosi orale e malattia di Alzheimer. Di seguito, riprendendo alcuni degli studi già citati, verrà approfondita tale relazione.

Tra le tante specie batteriche che colonizzano il cavo orale, come è stato riportato più volte, i principali responsabili della parodontite sono: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Diversi tipi di specie di *Treponema* orale sono stati trovati in campioni di cervello di AD, che includono *Treponema amylovorum*, *Treponema denticola*, *Treponema maltophilum*, *Treponema medium*, *Treponema pectinovorum* e *Treponema socranskii*. È stato inoltre segnalato che gli antigeni di *Treponema*

*pectinovorum* e *Treponema socranskii* erano situati a livello dei gangli trigeminali [26]. Questa scoperta non dovrebbe però sorprendere perché *Treponema denticola* fa parte dello stesso genere tassonomico del *Treponema pallidum* (fattore eziologico della sifilide), che ha la capacità di invadere il SNC e provocare la deposizione di amiloide [66]. Anche i lipopolisaccaridi (LPS), componenti della membrana cellulare esterna dei batteri Gram-negativi (in particolare di *Porphyromonas gingivalis*), sono stati trovati nel tessuto cerebrale di pazienti con AD, 12 ore post-mortem. Inoltre, la risposta dell'ospite nei confronti di una disbiosi orale causa un aumento dell'infiltrato infiammatorio locale, determinando la produzione di elevati livelli di citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6, e TNF $\alpha$  che, attraverso la circolazione sistemica, raggiungono il cervello determinando un aumento della produzione di A $\beta$  e l'iperfosforilazione della proteina tau, portando a neurodegenerazione, demenza ed infine malattia di Alzheimer [26].

Difatti, le citochine pro-infiammatorie (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e altre) costituiscono delle importanti molecole di segnalazione capaci di mediare la neuroinfiammazione. Il TNF $\alpha$  gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e nelle funzioni del SNC, inclusa la compliance dei neuroni, la cognizione e il comportamento. Quando nel cervello si ha la presenza di infezioni, traumi, aggregati proteici endogeni anormali, come i peptidi amiloide- $\beta$  (A $\beta$ ) nell'AD, viene attivata la secrezione di TNF $\alpha$  da parte dalle cellule gliali. Inoltre, è stato dimostrato che il TNF $\alpha$  attiva le cellule immuno/gliali portando all'aumento della proteina precursore  $\beta$  dell'amiloide e dei depositi di A $\beta$  in vitro. Riguardo all'IL-1 $\beta$ , esiste una stretta correlazione tra i livelli di questa interleuchina e la neuroinfiammazione nell'AD. L'IL-1 $\beta$  ha la capacità di innescare la produzione di vari mediatori infiammatori tramite l'attivazione delle cellule della microglia. È stato inoltre dimostrato la sua capacità di promuovere la trasformazione di A $\beta$  dalla sua forma non fibrillare a fibre A $\beta$  insolubili, portando ad un aumento della formazione di

placca. Infine la sovraregolazione di IL-6 nei topi transgenici è stata associata a una grave disfunzione neurologica. Difatti un altro studio aveva mostrato che i topi carenti di IL-6 mostravano una migliore e più rapida acquisizione delle capacità di apprendimento e di memoria [67].

Oltre alle interleuchine, anche i patogeni del microbioma orale tra cui batteri ma anche virus e lieviti, possono contribuire al meccanismo d'azione patogeno nell'AD come riportato nella tabella (Tab.1).

<b>Batteri orali</b>	<b>Meccanismo d'azione patogeno nell'AD</b>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Neuroinfiammazione (rilascio di LPS e deposizione di A $\beta$ )
<i>Treponema denticola</i>	Neuroinfiammazione (rilascio di LPS e deposizione di A $\beta$ )
<i>Treponema socranskii</i>	Neuroinfiammazione (rilascio di LPS e deposizione di A $\beta$ )
<i>Treponema pectinovorum</i>	Neuroinfiammazione (rilascio di LPS e deposizione di A $\beta$ )
<i>Treponema medio</i>	Neuroinfiammazione (rilascio di LPS e deposizione di A $\beta$ )
<i>Treponema amylovorum</i>	Neuroinfiammazione (rilascio di LPS e deposizione di A $\beta$ )
<i>Treponema maltophilum</i>	Neuroinfiammazione (rilascio di LPS e deposizione di A $\beta$ )
<i>Salmonella abortus</i>	Neuroinfiammazione e fosforilazione della proteina tau
<i>Tannerella forsythia</i>	Neuroinfiammazione e deposizione di A $\beta$
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Neuroinfiammazione
<i>Prevotella intermedia</i>	Neuroinfiammazione
<b>Virus orali</b>	
<i>Virus dell'Herpes simplex (HSV)</i>	Accumulo di A $\beta$
<b>Lieviti orali</b>	
<i>Candida albicans</i>	Neuroinfiammazione
<i>Candida glabrata</i>	Neuroinfiammazione

**Tabella 1.** Batteri, virus e lieviti del microbioma orale e il loro meccanismo d'azione patogeno nell'AD [26].

Come è possibile notare, i meccanismi principali che i patogeni orali possono causare a livello celebrare sono: neuroinfiammazione, fosforilazione della proteina tau e accumulo di A $\beta$ , caratteristiche distintive dell'AD [26]. Per neuroinfiammazione si intende un processo correlato all'insorgenza di diversi disturbi neurodegenerativi e contribuisce alla patogenesi e alla progressione dell'AD [68].

È stato suggerito che la neuroinfiammazione acutizza le caratteristiche distintive dell'AD inclusi i depositi di A $\beta$  e determinando l'iperfosforilazione di tau che possono causare sia dei danni ai tessuti ma anche favorire la risposta infiammatoria, creando un circolo vizioso di infiammazione e distruzione dei tessuti. Le citochine pro-infiammatorie associate all'AD sono le interleuchine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF $\alpha$ , TNF- $\beta$  e l'interferone (INF) - $\gamma$ , presenti in concentrazioni maggiori a livello sistemico rispetto ad un soggetto non-AD. Il compito di queste citochine è difendere il tessuto dai patogeni, tuttavia quando si ha un'un'infiammazione incontrollata, eccessiva o cronica, in un ospite suscettibile, queste possono determinare un danno tissutale, contribuendo alla patogenesi dell'AD. Nella neuroinfiammazione, le due principali cellule coinvolte, sono le cellule microgliali e gli astrociti. Le cellule microgliali appartengono al sistema immunitario innato e funzionano per mantenere l'omeostasi neuronale rimuovendo le cellule morte, i rifiuti cellulari e l'A $\beta$  senza l'induzione della risposta infiammatoria. Oltre a ciò, la microglia svolge un servizio di sorveglianza per captare gli agenti patogeni e/o danni ai tessuti. Numerose sostanze, associate ai patogeni, come il lipopolisaccaride e il peptidoglicano, oppure pattern molecolari associati al danno e fibrille A $\beta$ , attivano le cellule microgliali. Una volta attivate, queste possono produrre citochine pro-infiammatorie e radicali liberi nel tentativo di difendere il tessuto dall'insulto patogeno. L'attivazione della microglia è altamente associata a neurotossicità e infiammazione, che possono danneggiare ulteriormente il tessuto, difatti quando le microglia si attivano esageratamente, con l'avanzare dell'età inoltre perdono la capacità di fagocitare efficacemente l'A $\beta$  pur rilasciando citochine pro-infiammatorie che portano, come abbiamo detto più volte, alla neuroinfiammazione.

Gli astrociti, normalmente coinvolti nella neurotrasmissione e nella difesa della barriera emato-encefalica (BEE) vengono attivati nelle prime fasi dell'AD a causa di un aumento dei livelli di

calcineurina<sup>4</sup> e dell'accumulo di A $\beta$ . Gli studi scientifici eseguiti nei modelli murini di AD, dimostrano che bloccando la via di segnalazione della calcineurina, responsabile dell'attivazione degli astrociti, si riduce il deposito di placca A $\beta$  e si migliora la funzione cognitiva e sinaptica. Le prove hanno rivelato che gli astrociti interiorizzano l'A $\beta$  con lo scopo di immagazzinarlo ma in realtà si viene a verificare la tossicità neuronale nel cervello di AD. Difatti è stato dimostrato che elevate quantità di A $\beta$ 1-42 si concentrano negli astrociti e proprio per questo motivo vengono considerati responsabili della deposizione di A $\beta$  [25].

Perciò, dopo aver accennato i meccanismi di batteri parodontali responsabili dell'insorgenza della parodontite ma anche coinvolti nei meccanismi dell'Alzheimer, verrà approfondita, attraverso studi e ricerche, la correlazione tra la parodontite e l'AD.

### 4.3 La parodontite e la malattia di Alzheimer: studi e ricerche sulla loro correlazione

La correlazione tra parodontite e malattia di Alzheimer è chiaramente confermata in letteratura. Diversi studi scientifici effettuati fino ad oggi cercano di dimostrare l'ipotesi che la parodontite sia causalmente correlata all'AD. Un numero crescente di prove suggerisce che l'infiammazione cronica e la disbiosi microbica contribuiscono nello sviluppo della malattia di Alzheimer. In tutto il mondo, circa 47 milioni di persone ha la demenza e nel 60%-80% è stata diagnosticata la malattia di Alzheimer. Si ipotizza che entro il 2050 il numero delle persone affette da demenza arrivi a 100 milioni, causando delle ripercussioni sia sulla famiglia che sulla società.

---

<sup>4</sup> La calcineurina è una proteina con attività fosfataseica, anche nota come PPP3CA (protein fosfatasi 3). È una serina / treonina fosfatasi controllata dal calcio intracellulare, ed originariamente identificata in estratti di cervello dei mammiferi. Questa fosfatasi è stata coinvolta in una grande varietà di risposte biologiche, compresa l'attivazione dei linfociti, l'attività neuronale, lo sviluppo muscolare, la crescita dei neuriti, e la morfogenesi delle valvole cardiache. È di fondamentale importanza nel meccanismo di signaling che porta all'attivazione dei linfociti, soprattutto di quelli T [69].

Per ridurre il rischio di questo aumento tra circa 30 anni, è fondamentale intervenire sui fattori di rischio modificabili che possono ritardare l'insorgenza e ridurre di circa 9 milioni, il numero dei casi previsti nei prossimi anni. È sempre più evidente che un costante e protratto stato infiammatorio cronico, è un fattore di rischio per l'AD.

Tra le varie cause di infiammazione cronica vi è appunto la parodontite, caratterizzata da uno stato infiammatorio cronico locale, che si sviluppa in risposta alla disbiosi microbica e che nel tempo evolve in sistemica [70]. È soprattutto causata da batteri anaerobi Gram-negativi, responsabili nella formazione di biofilm sottogengivale. La presenza di specifici batteri parodontopatogeni (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*) induce infezioni locali e sistemiche tramite il rilascio di citochine pro-infiammatorie nella circolazione sistemica (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), prostanoidei, metalloproteinasi della matrice (MMP)) e che a loro volta, come è stato detto precedentemente, hanno la capacità di raggiungere il cervello andando a favorire la formazione dei tratti distintivi di AD: produzione di placche A $\beta$  e l'iperfosforilazione della proteina tau. In pratica, diversi studi scientifici hanno dimostrato una stretta associazione tra cattiva salute orale e il declino cognitivo, adducendo anche un ruolo alla mancanza dei denti e ad una masticazione ridotta. Ciò che distingue la parodontite dalle altre patologie orali è appunto la perdita dei denti preceduta da recessioni gengivali, seguite da riassorbimento osseo e perdita dei tessuti di sostegno che circondano il dente [26, 35]. La letteratura suggerisce una relazione ancora più complessa, ovvero di una correlazione bidirezionale tra parodontite e AD, ovvero non solo la parodontite può influire con diversi meccanismi sull'AD, ma anche la malattia di Alzheimer può determinare disbiosi orale, infiammazione ed infine parodontite poiché i pazienti AD non riescono più ad aderire alle pratiche di igiene orale domiciliare [71]. La ricerca scientifica in

questo contesto richiede ancora molto sforzo per chiarire il ruolo della parodontite nella patogenesi della malattia di Alzheimer [70].

#### 4.3.1 Parodontite e AD: Lo stato dell'arte

Le ricerche scientifiche riguardanti la correlazione di queste due patologie, sono contrastanti: alcune sostengono la tesi della correlazione tra le due patologie, mentre altre no. Questi risultati contrastanti possono essere spiegati dalla diversità delle metodologie utilizzate. Alcuni studi in silico e review sistematiche includenti database quali "MEDLINE", "EMBASE" e "Cochrane library", hanno mostrato e quindi validato la correlazione tra le due patologie anche utilizzando la "Newcastle-Ottawa scale"<sup>5</sup> mostrandone anche l'importanza e l'applicabilità clinica. Negli studi che verranno mostrati, sono stati utilizzati i criteri di Hill<sup>6</sup>.

Complessivamente sono stati individuati 14 studi longitudinali, 6 casi-controllo e 7 studi trasversali. I 14 studi longitudinali, 7 dei quali sono prospettici e gli altri 7 retrospettivi, sono stati condotti in diverse parti del mondo includendo in alcuni solo popolazioni con ampia fascia d'età, mentre in altri solo anziani. Uno studio include solo maschi, un altro solo femmine, tutti gli altri entrambi i sessi. Anche i 6 studi caso-controllo sono stati condotti in diversi paesi del mondo. La popolazione inclusa ha un'età  $\geq 50$  anni. Infine gli studi trasversali condotti anche essi in diversi paesi includevano tutti, eccetto uno, soggetti di età  $\geq 65$  anni [70].

---

<sup>5</sup> Gli studi non randomizzati, compresi gli studi caso-controllo e di coorte, inclusi in una revisione sistematica e/o in meta-analisi, possono essere difficili da valutare nella loro qualità e nel comprendere gli studi non randomizzati. La Newcastle-Ottawa Scale (NOS) è uno strumento sviluppato per valutare la qualità degli studi non randomizzati con il suo design, contenuto e facilità d'uso, diretti al compito di incorporare le valutazioni di qualità nell'interpretazione dei risultati meta-analitici. È una collaborazione in corso tra le Università di Newcastle, Australia e Ottawa, Canada [72].

<sup>6</sup> Nel 1965, l'epidemiologo inglese Sir Austin Bradford Hill, introdusse nove criteri per fornire prove epidemiologiche in una reazione causale tra una causa presunta e un effetto osservato. I criteri sono: forza, coerenza sulla riproducibilità, specificità, temporalità, gradiente biologico, plausibilità, coerenza, evidenze scientifiche e analogia [73].

Tzeng et al. e Lee et al. hanno condotto degli studi in soggetti con età  $\geq 20$  anni e  $\geq 65$  anni, dimostrando che chi ha la parodontite presenta un rischio maggiore di sviluppare AD. In un altro studio i 19.674 soggetti con parodontite non trattata, mostravano un rischio maggiore di sviluppare demenza rispetto a coloro che avevano ricevuto cure odontoiatriche [74]. Tuttavia il rischio di sviluppare demenza per coloro che hanno la parodontite è leggermente superiore rispetto ai pazienti senza ulteriori fattori di rischio come fumo, alcool, assenza di attività fisica [75]. Anche i 6 studi caso-controllo confermarono l'aumento dell'incidenza di AD nei pazienti con parodontite [70]. Un altro studio che conferma questa tesi, senza utilizzare i criteri di Hill, è quello di Chen et al., del 2017, che hanno eseguito uno studio di coorte retrospettivo per determinare l'influenza della parodontite cronica sull'incidenza di un aumento del deterioramento cognitivo nei pazienti con AD. Più in dettaglio, questo studio di coorte retrospettivo ha utilizzato il *National Health Insurance Research Database di Taiwan* per selezionare 9.291 partecipanti con una diagnosi di parodontite cronica tra il 1997 e il 2004. Inoltre, sono stati studiati 18.672 pazienti senza parodontite cronica. Lo studio ha dimostrato che una parodontite cronica protratta per 10 anni aumenta il rischio di sviluppare AD [26, 76]. Ritornando agli studi effettuati con i criteri di Hill, Stewart et al., in uno studio di coorte prospettico di 947 soggetti anziani, hanno evidenziato che coloro che presentano un'inflammation gengivale, hanno un declino cognitivo maggiore in un periodo di 2 anni rispetto ai soggetti senza infiammazione gengivale. Un altro studio interessante di Iwasaki et al., sottolinea che i pazienti affetti da grave parodontite, hanno maggiori probabilità di avere un declino cognitivo da 3 ai 5 anni. Però, in un altro studio prospettico di 558 adulti con età 52-75 anni seguiti per 8 anni, nei pazienti con parodontite non si è assistito ad un declino cognitivo maggiore rispetto a quelli sani. Altri studi affascinanti si concentrarono, invece, sull'importanza di uno dei criteri di Hill che è la temporalità. La malattia di Alzheimer dovrebbe essere

preceduta dallo sviluppo della parodontite e questo criterio è essenziale per determinare la causalità. Pertanto, è importante avere nello studio già dei soggetti che presentano una perdita di osso, una perdita di attacco clinico, o anche una diagnosi clinica perché la loro presenza all'inizio dello studio supporta già la relazione temporale. Uno studio interessante di Sparks Stein et al. mostra un aumento degli anticorpi contro i batteri della malattia parodontale in soggetti, circa 10 anni prima del deterioramento cognitivo e suggerisce che la parodontite potrebbe rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza e la progressione dell'AD [77]. Anche Noble et al., trovarono alti livelli di anticorpi di *Actinomyces naeslundii*, con un'elevata propensione a suscitare una risposta infiammatoria, associata ad un aumento del rischio di sviluppare l'AD. Questi studi sottolineano che l'esposizione ai batteri orali, combinata con una risposta dell'ospite, si verificano prima dell'inizio della demenza. Anche altri studi, condotti su modelli murini hanno dimostrato che l'infiammazione sistemica indotta da *Porphyromonas gingivalis* e il suo LPS, provoca una neuroinfiammazione e lo sviluppo di AD [70].

Altre ricerche scientifiche che non hanno utilizzato i criteri di Hill ma sono importanti da citare sono: lo studio di Poole et al. (2013), in cui si suggerisce una connessione diretta tra disbiosi orale e AD, riportando la presenza di batteri parodontopatogeni in soggetti con AD; quello di Dominy et al. (2019), in cui viene mostrata la presenza di *Porphyromonas gingivalis* e i suoi fattori di virulenza, tra cui le gingipain, sono stati rilevati esclusivamente nel cervello dei pazienti con AD rispetto ai controlli e la capacità di questo patogeno di migrare dalla bocca al cervello in modelli murini, aumentando la produzione di A $\beta$ 1-42 ed esercitando significativi effetti neurotossici; Díaz-Zúñiga et al. (2019), hanno dimostrato che l'LPS di *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, è implicato nell'AD e questo studio verrà approfondito di seguito [71]. Un altro importante fattore da citare è il genotipo ApoE (apolipoproteina E) che sembra essere coinvolto in modo cruciale nella neuroinfiammazione e può anche contribuire a migliorare la

colonizzazione cerebrale di *Porphyromonas gingivalis* [78]. La mancanza di proteina ApoE funzionale e l'aumento dell'infiammazione sistemica, osservata nella parodontite, inducono inoltre una compromissione della barriera emato-encefalica (BEE) che quindi permetterebbe ai patogeni parodontali, ormai penetrati nella circolazione sistemica e capaci di causare batteriemia, di invadere il cervello [79]. Tutto ciò rappresenterebbe un rischio nello sviluppo precoce di AD e di declino cognitivo [71].

#### 4.4 La parodontite nella progressione dell'AD

Per comprendere quale meccanismo patogenetico stia alla base di questa correlazione tra parodontite e Alzheimer, è fondamentale tenere a mente che l'AD è una patologia che si manifesta clinicamente molti anni dopo le prime alterazioni molecolari. Difatti l'AD è caratterizzata da tre fasi: la fase preclinica, la fase prodromica ed infine la demenza: nella prima fase, si ha l'inizio della patologia ma senza nessun tipo di sintomo; nella fase prodromica sono invece presenti dei segni clinici di un lieve deterioramento cognitivo che causano l'inizio dell'AD; nell'ultima fase vi è un inizio conclamato di malattia di Alzheimer. La parodontite può influenzare ogni fase dell'AD, ad esempio già nella prima fase, gli studi dimostrano che la parodontite può attivare diversi processi patogenici come la produzione di  $\beta$ -amiloide, fosforilazione della proteina tau, alterazione del normale funzionamento sinaptico, neuronale, di neurotrasmissione e risposta immunitaria. Inoltre, l'infiammazione e la carica batterica di cui è caratterizzata la parodontite, possono anch'esse influenzare ulteriormente questi processi e contribuire a danni irreversibili come la neurodegenerazione o la perdita neuronale.

Come è stato precedentemente riportato, la parodontite è contraddistinta dalla presenza di tasche parodontali che hanno la capacità di ospitare circa 200 specie batteriche capaci di causare nell'ospite la disbiosi del microbioma orale. Inoltre, il rivestimento epiteliale ulcerato, presente

nella tasca parodontale, può raggiungere una dimensione di 20cm<sup>2</sup>, accogliendo batteri e citochine capaci di accedere alla circolazione sistemica e al tessuto nervoso, facilitando così gli effetti negativi della parodontite nel cervello [70]. Pertanto, la circolazione sanguigna svolge un ruolo molto importante nella comunicazione tra bocca e cervello in quanto il microbiota orale viene trasportato attraverso il flusso sanguigno durante l'uso dello spazzolino, del filo interdentale, della masticazione in pazienti con parodontite, causando batteriemia. Anche l'aumento delle risposte pro-infiammatorie può indebolire la barriera ematoencefalica, favorendo la penetrazione di batteri, LPS o altri prodotti tossici [26]. Kamer et al., hanno evidenziato che l'entrata dei batteri, dei loro prodotti e delle molecole pro-infiammatorie nella circolazione sistemica, stimolano ulteriormente la risposta di fase acuta da parte del fegato, amplificando così l'infiammazione iniziale. Coerentemente con questa osservazione, diversi studi mostrano un'elevata concentrazione della proteina C-reattiva (PCR) in soggetti con moderata e severa parodontite [70]. Lo studio di Winning et al. (2015), dimostra una correlazione tra infezione da *P. gingivalis* ed i livelli di PCR, soprattutto nei pazienti anziani. Questa relazione venne pure confermata in altri studi, come quello di Gomes-Filho et al., del 2011, in cui i pazienti con parodontite grave, avevano un aumento dei livelli sierici di PCR rispetto alla popolazione di controllo non affetta. Pertanto il livello di PCR aumenta proporzionalmente alla gravità della parodontite [80]. Il trattamento della parodontite va però a determinare una riduzione dei livelli della PCR sistemica.

Come abbiamo detto precedentemente, i batteri e le molecole infiammatorie, attraverso la circolazione sistemica, possono accedere al cervello ma mediante diverse vie: a livello delle aree dell'interfaccia emato-encefalica in cui la BEE è permeabile; attraverso i capillari fenestrati della BEE; attraverso l'uso di specifici trasportatori; nelle vie di uscita del liquido cerebrospinale; oppure nelle zone della BEE con aumentata permeabilità. Una volta che hanno

raggiunto il cervello, possono attivare le cellule endoteliali e leptomeningee per trasdurre i segnali di attivazione al cervello e determinare un aumento della neuroinfiammazione. I patogeni, i loro LPS e altri fattori virulenti, entrano nel cervello applicando delle strategie simili alle molecole infiammatorie. Ad esempio il *Porphyromonas gingivalis*, usa il recettore Toll-like 4 (TLR4) o Toll-like 2 (TLR2). Il lipopolisaccaride si lega a MD2 (antigene linfocitario 96), che si lega a sua volta con i recettori Toll-like, attivando così una trasduzione del segnale in più step determinando un aumento delle citochine. La stimolazione cronica indotta dai lipopolisaccaridi nelle terminazioni neuronali, può causare danni ai neuroni ed indurre l'attivazione della glia e degli astrociti. Quindi, nel cervello, i batteri e le molecole infiammatorie contribuiscono alla neuroinfiammazione, uno dei fattori di rischio di AD [70].

Pertanto, i presunti meccanismi che potrebbero spiegare come la parodontite possa influenzare l'omeostasi del SNC si possono riassumere in: (1) traslocazione di batteri nel flusso sanguigno (batteriemia) o invasione nel cervello attraverso il nervo trigemino (ad esempio, *Porphyromonas gingivalis*); e (2) produzione di citochine pro-infiammatorie che entrano nel flusso sanguigno e agiscono a livello sistemico o che raggiungono il cervello attraverso la via dei nervi periferici [80]. In entrambi i casi si viene a scatenare un processo infiammatorio a livello cerebrale che contribuisce alla neuroinfiammazione, influenzando i processi iniziali dello sviluppo di AD.

#### 4.4.1 Batteriemia e teoria infiammatoria

La parodontite e l'AD hanno un'eziopatogenesi diversa ma condividono dei fattori di rischio in comune che possono influenzarne l'insorgenza, la progressione e la gravità. L'infiammazione gioca un ruolo cruciale nell'AD e le reazioni infiammatorie che si verificano a livello periferico hanno un ruolo importante sullo stato infiammatorio cerebrale, favorendo la progressione della

malattia. Ad esempio un'inflammatione periferica può essere determinata dai batteri parodontopatogeni che colonizzano il parodonto, dando luogo alla parodontite. Pertanto i due meccanismi associati alla parodontite che potrebbero essere correlati all'AD sono i batteri e l'inflammatione. Il meccanismo infiammatorio è causato dall'interazione tra i batteri parodontali e l'ospite i quali provocano la produzione locale di molecole infiammatorie come IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  e PCR. Nelle parodontiti più severe, le citochine pro-infiammatorie riescono a raggiungere il SNC attraverso il flusso sanguigno ed indurre un'inflammatione sistemica. Inoltre, queste molecole, sono in grado di attivare il nervo trigemino nel cavo orale, determinando un ulteriore aumento della produzione di citochine cerebrali. Queste citochine pro-infiammatorie possono avere un effetto sinergico verso la glia attivata, causando una reazione amplificata che determina la progressione di AD [66]. Ad esempio, lo studio già riportato prima di Kamer et al. nel 2009, avevano evidenziato che i livelli sierici elevati di TNF $\alpha$  e anticorpi sierici contro *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia* erano presenti nei pazienti con AD rispetto ai controlli [71].

Anche Stein et al., nel 2012, in uno studio longitudinale, hanno analizzato i livelli sierologici di anticorpi di sette patogeni parodontali (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella intermedia*) in 158 soggetti. Su 158 partecipanti, 81 hanno sviluppato un declino cognitivo e 77 sono rimasti cognitivamente intatti. I livelli di anticorpi sono stati confrontati tra i due gruppi. I risultati mostravano che nei pazienti che hanno sviluppato AD, c'è un'alta risposta anticorpale verso *F. nucleatum* e *P. intermedia* rispetto ai pazienti senza Alzheimer. Questo studio dimostra che le risposte anticorpali elevate contro i batteri coinvolti nella parodontite inizia molti anni prima dello sviluppo del deterioramento cognitivo.

Sebbene dunque ci siano evidenze sperimentali sulla correlazione tra le due patologie, non è ancora chiaro se l'infiammazione periferica favorisca l'insorgenza o la progressione della malattia o addirittura entrambi. Si ipotizza però che i batteri responsabili della patogenesi della parodontite, possano essere coinvolti nella patogenesi dell'AD. Difatti questi batteri riescono a raggiungere il SNC ed innescare malattie neurodegenerative, interagendo con meccanismi patologici preesistenti. Anche i fattori di virulenza dei batteri parodontali, come il lipopolisaccaride, causano il rilascio di citochine quando raggiungono il SNC [66]. Diversi studi hanno confermato questa ipotesi. Godbout et al nel 2005, avevano scoperto che l'iniezione periferica di LPS nei topi può attivare la microglia, inducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie, come le interleuchine e TNF $\alpha$ . Anche Sheng et al. due anni prima, hanno dimostrato che i topi infusi con LPS presentavano una maggiore neuroinfiammazione associata alla maggiore espressione ed elaborazione dei livelli di APP e A $\beta$ 40 / 42 all'interno dei neuroni. Infine, Lee e colleghi nel 2010 hanno dimostrato che nei topi rTg4510 che esprimono una proteina tau mutata (TauP301L) e sviluppano taupatia tra i 3 e 5 mesi di età, l'infusione di LPS aumenta l'attivazione della microglia e le formazioni di groviglio [71]. Il lipopolisaccaride capace di stimolare le cellule gliali, è principalmente quello associato a *Porphyromonas gingivalis*. Questo LPS ha la capacità di indurre il rilascio da parte della glia, sia del protossido di azoto che della prostaglandina E2, come evidenziato da studi effettuati sui topi. Questa induzione è mediata dalla presenza di recettori come CD14, TLR-2 e TLR-4 [66].

Inoltre l'LPS è stato collegato anche all'aumento dei livelli di peptidi A $\beta$  neuronali e alla conseguente interruzione della permeabilità del BEE e del danno cerebrale in modelli animali di AD. Pertanto, questi dati indicano che i batteri possono indurre danni infiammatori locali, che, in caso di infiammazioni croniche, rappresentano un fattore scatenante della neuroinfiammazione e promuovente la neurodegenerazione [71].

Gli studi sulla correlazione tra parodontite e AD sono piuttosto recenti e non forniscono ancora informazioni sulla correlazione diretta tra parodontite e AD; però, ci sono prove indirette come la perdita dei denti, causate da diverse situazioni come la carie, patologie endodontiche o la parodontite, che possono essere fondamentali nella correlazione. Uno studio svedese ha affermato la forte relazione tra perdita dei denti e AD nei gemelli omozigoti. Invece, lo studio di Sparks Stein e colleghi (2007), dopo aver raccolto 10 valutazioni cognitive annuali di 144 partecipanti a Milwaukee nel *Nun Study*<sup>7</sup>, suggeriscono che i pazienti con un numero ridotto di denti, presentano un rischio di 6,4 volte superiore di sviluppare AD rispetto alla popolazione in generale [81]. Gli autori del *Nun Study* ipotizzano che questo rischio maggiore sembra essere associato alla mancanza dell'allele APOE4ε. Pertanto i pazienti senza l'allele APOE4ε hanno una migliore immunità contro i batteri parodontali rispetto ai pazienti con l'allele APOE4ε e tale immunità rappresenta la causa di una maggiore incidenza della malattia di Alzheimer [66]. Di seguito verranno illustrati i principali batteri parodontopatogeni implicati sia nella parodontite che nell'AD, tra cui principalmente *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

#### 4.4.2 Il meccanismo di *Porphyromonas gingivalis*

Uno dei principali agenti eziologici nella patogenesi e nella progressione degli eventi infiammatori della parodontite è il *Porphyromonas gingivalis*, batterio Gram-negativo anaerobio obbligato, non mobile e asaccarolitico. Il nome *Porphyromonas* deriva dall'aggettivo greco *porphyreos* (viola) e dal sostantivo greco *monas* (unità). Quindi, la parola *Porphyromonas* significa *cellula di porfirina* poiché le colonie sulle piastre di agar sangue

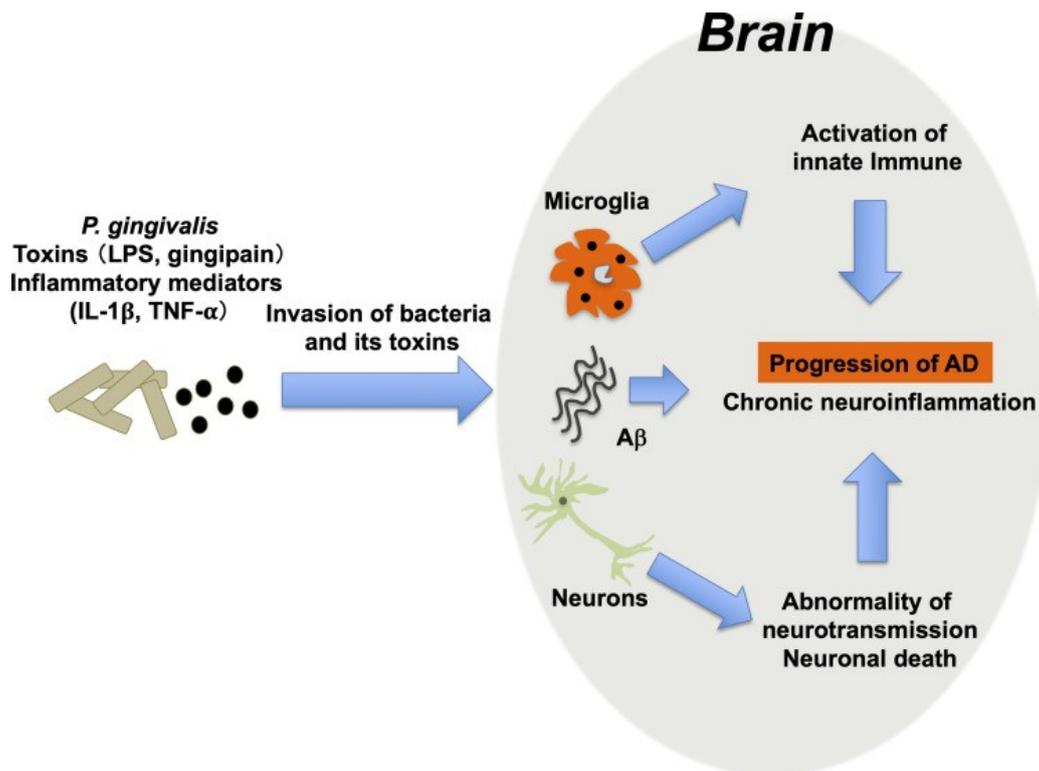
---

<sup>7</sup> Il "Nun Study of Aging and Alzheimer's Disease" è uno studio longitudinale continuo, iniziato nel 1986, per esaminare l'insorgenza della malattia di Alzheimer [82].

diventano nere dopo 6-10 giorni a causa dell'accumulo di EME. Questo batterio colonizza principalmente il solco sottogengivale della cavità orale umana. Per sopravvivere nella tasca parodontale profonda, in cui le disponibilità di zucchero sono basse, attiva la produzione di energia attraverso la fermentazione di amminoacidi. È un colonizzatore secondario della placca dentale e aderisce ai colonizzatori primari come *Streptococcus gordonii* e *Prevotella intermedia*. Uno studio di Bodet et al., nel 2006, ha evidenziato che questo batterio asaccarolitico è associato a *Treponema denticola*, andando a costituire il complesso batterico rosso, altamente responsabile delle lesioni parodontali avanzate. I fattori di virulenza di *Porphyromonas gingivalis*, oltre a essere definiti i costituenti o metaboliti essenziali nelle varie fasi del ciclo vitale dell'organismo, sono anche capaci di causare danni all'ospite penetrando nelle gengive e causando distruzione dei tessuti per induzione dell'infiammazione. Inoltre i fattori di virulenza danno la capacità al batterio di poter colonizzare nei tessuti dell'ospite grazie alla presenza di fimbrie, capsule, lipopolisaccaride (LPS), acidi lipoteicoici, emoagglutinine, gingipain, proteine e vescicole della membrana esterna. Se abbiamo un ospite suscettibile, questi fattori di virulenza possono provocare una rapida e significativa distruzione dei tessuti parodontali, riassorbimento osseo, induzione delle risposte dell'ospite mediante produzione di citochine, nonché inibizione dei meccanismi protettivi dell'ospite [83]. Inoltre, il *P. gingivalis* e le sue tossine, dal cavo orale possono trasferirsi al cervello principalmente attraverso la circolazione sistemica [84]. Ilievski et al. nel 2018, hanno evidenziato che una volta che il *P. gingivalis* raggiunge il cervello, una serie di enzimi, come la catepsina B e le gingipain, vanno ad interagire con la proteina precursore dell'amiloide (APP) e la tau neuronale determinando la formazione di beta-amiloide (A $\beta$ ) e grovigli neurofibrillari (NFT) che sono i tratti distintivi cardinali dell'AD [85].

Inoltre, sempre nello studio di Poole et al., nel 2013, avevano dimostrato come sia il LPS che le gingipain (Kgp, RgpA e RgpB), erano stati definiti neurotossici sia in vitro che in vivo attraverso un effetto sulla proteina Tau [86]. Il *P. gingivalis*, oltre a determinare l'aumento della produzione di A $\beta$ , riescono ad attivare la microglia insieme ad A $\beta$  e Tau. Tutto ciò innescerebbe una risposta immunitaria innata nel cervello capace di danneggiare i neuroni. Tale infiammazione cerebrale cronica e degenerazione dei neuroni possono esacerbare la condizione patologica dell'AD [84].

Un altro fattore di virulenza di *P. gingivalis* è la capacità di evadere il sistema immunitario attraverso la soppressione dell'immunità adattativa. Si ipotizza che tale evasione associata a distruzione locale dei tessuti indotta da gingipain, consenta a *P. gingivalis* di migrare dalla bocca verso il cervello, dove si pensa possa accedere e colonizzare attraverso la gingipain [25]. Per comprendere meglio il ruolo di questo parodontopatogeno sull'eziopatogenesi dell'AD, è importante dimostrare le principali associazioni che gli studi scientifici hanno trovato tra *Porphyromonas gingivalis* e Alzheimer quale il ruolo del suo LPS, della gingipain, degli inflammasomi, della correlazione con il sistema del complemento, la citrullinazione e l'iperfosforilazione della proteina tau (Fig.7).



**Figura 7.** Possibili meccanismi attraverso i quali la malattia parodontale e *P. gingivalis* aggravano la malattia di Alzheimer [84].

#### 4.4.2.1. *Porphyromonas gingivalis* e il suo LPS nella malattia di Alzheimer

La prima associazione tra questo batterio e l'AD viene mostrata attraverso diversi studi scientifici i quali evidenziano l'azione infiammatoria di *P. gingivalis* contro la microglia, mediata dal suo LPS. Diversi studi di Neumann et al. e di Koellhoffer et al., hanno dimostrato che l'invecchiamento e l'immunosenescenza, alterano la funzione fagocitica della microglia, la quale non riuscendo più a rimuovere totalmente l'accumulo di rifiuti molecolari e cadaveri cellulari, genera un'inflammatione. Nei pazienti con AD, è stata dimostrata la presenza di microglia distrofica con arresto della crescita e marcatori senescenti, anche se non è ancora ben chiara la differenza tra fenotipo reattivo e distrofico. Gli studi di Sietta et al. e Davies et al., hanno riportato che le microglia senescenti preservano comunque la capacità di attivare le risposte infiammatorie anche se possono perdere le loro funzioni neuroprotettive. Ad esempio,

è stato evidenziato che le microglia senescenti sovraregolano i loro TLR, innescando un'inflammatione esagerata in risposta alla stimolazione minima di LPS. D'altra parte, la presenza continua di LPS nell'ambiente microgliale, induce immunosenescenza con fagocitosi carente. Recentemente sono state segnalate microglia "scure" e ipervigilanti, che probabilmente rappresentano cellule senescenti con funzione fagocitica aberrante. Infatti, diversi studi riportano che in presenza di LPS, la microglia senescente e gli astrociti diventano neurotossici, capaci di fagocitare neuroni e sinapsi sane. Altri studi preclinici di Liu et al., Magalhães et al., Hopp et al., Kametani e Hasegawa, hanno dimostrato che la microglia esposta a LPS promuove il traffico extracellulare di tau iperfosforilata, un fenomeno inibito da IL-10. Nel loro insieme, le microglia senescenti, incapaci di un'adeguata immunosorveglianza e fagocitosi, contribuiscono all'accumulo di rifiuti molecolari, cellule morte o morenti, inducendo inflammatione e immunosenescenza [87]. L'LPS attivando la microglia attraverso i recettori di riconoscimento dei pattern (PRR), induce la produzione di una quantità elevata di citochine pro-inflammatorie e contribuisce dunque sia all'inflammatione che alla neurodegenerazione nell'AD [88]. Wu et al., nel 2017, hanno dimostrato che LPS di *P. gingivalis* (LPS-Pg) iniettato in topi CatB-dipendenti induce la diminuzione della memoria e dell'apprendimento attraverso l'attivazione della catepsina B (CatB), una proteasi lisosomiale della cisteina capace di promuovere l'elaborazione e la secrezione di IL-1  $\beta$  maturo da parte della microglia attivata. In questo studio è stato ipotizzato che la CatB si attivi in seguito all'esposizione sistemica dei batteri parodontali (o loro fattori di virulenza), dando inizio alla patogenesi dell'AD [89]. Inoltre l'LPS-Pg può stimolare CD14, TLR-2 o TLR-4 e inviare segnali al nucleo tramite il percorso MyD88, che avvia una cascata di eventi che coinvolgono un'aumentata espressione di citochine pro-inflammatorie [90]. Un'altra caratteristica di *P. gingivalis* è che il suo LPS esiste in almeno due forme diverse, O-LPS e A-LPS. Quest'ultimo mostra eterogeneità che si verifica

come due isoforme, LPS 1435/1449 e LPS 1690. Queste isoforme possono produrre effetti opposti sull'attivazione di TLR-2 e TLR-4. La capacità di cambiare il suo LPS in LPS 1435/1449 o LPS 1690 aiuta *P. gingivalis* ad adattarsi all'ambiente infiammatorio locale, consentendogli di sopravvivere nei siti primari e distanti, specialmente nei compartimenti lisosomiali di diversi tipi di cellule tissutali [91]. Anche altri studi scientifici evidenziano come l'LPS-Pg può determinare danni cerebrali [66].

Infine l'esposizione sistemica cronica al LPS-Pg induce un aumento di A $\beta$  nei neuroni di topi CatB dipendenti di mezza età. Pertanto possiamo concludere che il presente studio mostra che l'esposizione sistemica cronica a LPS-Pg avvia fenotipi simili all'AD, inclusi deficit di apprendimento e di memoria, accumulo intracellulare di A $\beta$  nei neuroni e neuroinfiammazione mediata dalla microglia nell'ippocampo di topi di mezza età. Questa è la prima prova a sostegno di un'associazione causale tra l'esposizione cronica ai componenti dei batteri parodontali e un fenotipo simile all'AD nei topi di mezza età [89].

Un altro studio interessante di Zhang et al., mirava a capire il meccanismo che porta alla perdita di memoria a seguito della somministrazione intraperitoneale di LPS-Pg. Lo studio ha evidenziato che l'iniezione di LPS-Pg causava nei topi una compromissione della memoria e dell'apprendimento e inoltre un "debole desiderio" di affrontare la paura affermato dal "test di evitamento passivo". Inoltre è stata osservata l'attivazione delle cellule gliali (microglia e astrociti) nella corteccia e nelle regioni dell'ippocampo del cervello di questi topi insieme a un numero di citochine sovraregolate (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) [92].

Un altro studio di Nie et al. nel 2019, mostrarono che l'infezione di topi con *P. gingivalis* induceva la produzione di beta amiloide attraverso l'attivazione di CatB / NF- $\kappa$ B ("nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells") e l'aumento dell'espressione di TLR-2 e IL-1 $\beta$ .

Ciò è stato confermato anche negli studi di Hayashi et al. nel 2019 in cui scoprirono che iniettare continuamente LPS-Pg, causa non solo sarcopenia e lesioni cardiache nei topi AD giovani e di mezza età, ma anche un peggioramento della capacità di apprendere e memorizzare. Contrariamente a studi precedenti, Hayashi non identifica un aumento nell'espressione di TLR-2, TLR-4, NF- $\kappa$ B e Cox-2, indicando che una debole risposta infiammatoria da LPS-Pg non può modulare una risposta infiammatoria mediata da TLR.

Il ruolo di LPS-Pg nell'eziopatogenesi dell'AD è confermato anche in uno studio condotto da Poole et al. nel 2013 su tessuti cerebrali (post mortem) di pazienti con malattia di Alzheimer. Poole ha studiato la presenza di tre batteri patogeni parodontali (*P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*) in sezioni di tessuto cerebrale di pazienti con AD. È stato rilevato all'esame mediante immunofluorescenza indiretta, solo la presenza di *Porphyromonas gingivalis*. Inoltre, Poole ha fornito ulteriori prove dimostrando che le cellule gliali neuronali (SVGp1) adsorbono LPS da una coltura di *P. gingivalis*, che conteneva anche proteasi cisteina extracellulari (gingipain) e metaboliti come acido butirrico e propionico oltre a LPS. Di questi, LPS è stato adsorbito sulla superficie della membrana di una linea cellulare astrogliale, mentre la gingipain ha dimostrato una localizzazione intracellulare. Scoprirono inoltre che il LPS-Pg si lega alle cellule gliali, mentre altri studi hanno evidenziato che nel cervello di AD, è co-localizzato con placche A $\beta$  [66].

#### 4.4.2.2. *Porphyromonas gingivalis* e la gingipain nella malattia di Alzheimer

Un'altra correlazione tra *P. gingivalis* e AD è associata al fattore di virulenza gingipain. Difatti il *P. gingivalis* produce le gingipain, una cisteino-proteasi di cisteina formate da lisina-gingipain (Kgp), arginina-gingipain A (RgpA) e arginina-gingipain B (RgpB) [93].

Ci sono prove crescenti che i gingipain siano associati con l'AD. Uno studio di Ilverski et al. nel 2018 hanno dimostrato che, in seguito all'applicazione orale di *P. gingivalis* in topi giovani adulti, l'immunoreattività della gingipain è sia intra- che peri-nucleare e anche extracellulare, e sono state osservate infiammazioni cerebrali, neurodegenerazioni e produzione di  $\beta$ -amiloide nell'ippocampo. Inoltre, l'immunoreattività della gingipain è stata localizzata a livello intracellulare negli astrociti, nella microglia e nei neuroni dell'ippocampo. Non è ancora ben noto se i segnali immunoreattivi alla gingipain ottenuti utilizzando questi anticorpi siano derivati da *P. gingivalis* o dalle gingipain stesse nel cervello. Tuttavia, lo studio di Dorn et al. nel 2001, avevano affermato che *P. gingivalis* può invadere le cellule ospiti come le cellule endoteliali, e per questa ragione si può ipotizzare che il batterio può attraversare la barriera ematoencefalica compromessa ed invade i neuroni e le cellule gliali [94]. Un altro studio interessante di Dominy et al., nel 2019, identificarono le gingipain nel cervello dei malati di Alzheimer e i loro livelli erano correlati alla patologia della tau e dell'ubiquitina. Tuttavia ipotizzarono che l'infezione da *P. gingivalis* nella patogenesi dell'AD può avvenire attraverso la secrezione di gingipain, favorendone il danno neuronale. Come già abbiamo detto più volte precedentemente, l'infezione orale da *P. gingivalis* nei topi provoca una maggior produzione di A $\beta$  1–42, un componente delle placche amiloidi. Inoltre i gingipain sono risultati neurotossici in vivo e in vitro, generando effetti dannosi sulla tau, la proteina necessaria per la normale funzione neuronale. Questo studio ha utilizzato i Tissue Microarray (TMAs) contenenti i nuclei dei tessuti cerebrali di pazienti con AD e individui neurologicamente sani. Gli anticorpi specifici della gingipain CAB101 e CAB102, diretti rispettivamente a RgpB e Kgp, sono stati utilizzati per determinare il carico di gingipain nei nuclei del tessuto cerebrale. Per quanto riguarda la quantità di tau nei TMAs, è stato misurato utilizzando un anticorpo capace di riconoscere la tau fosforilata. I risultati mostrarono che il 96% (51 su 53) dei campioni di AD

era positivo per RgpB e il 91% (49 di 54) dei campioni di AD era positivo per Kgp. Sia il carico di RgpB che di Kgp, erano significativamente più alti nei cervelli di AD rispetto ai cervelli di controllo non-AD. Inoltre è stata rilevata una correlazione significativa sia tra RgpB e tau che tra Kgp e tau, dimostrando che la patologia tau è correlata al deterioramento cognitivo nell'AD. Infine sono stati colorati i TMAs per l'ubiquitina<sup>8</sup> che si accumula sia nei grovigli di tau che nelle placche A $\beta$ . Anche qui nei TMAs, c'era una correlazione significativa sia tra il carico di RgpB e Kgp con l'ubiquitina. Questi risultati sono coerenti con il concetto di AD preclinico, cioè lo stadio della malattia in cui la patogenesi è iniziata, ma i sintomi clinici non sono ancora presenti. In sintesi, entrambi gli antigeni RgpB e Kgp nel cervello hanno dimostrato indipendentemente una correlazione significativa con la diagnosi di AD, il carico di tau e il carico di ubiquitina. Lo studio ha anche analizzato il luogo in cui RgpB e Kgp si trovano nei pazienti con AD. L'ippocampo è una delle prime aree del cervello a essere danneggiate dalla malattia di Alzheimer. Inoltre è stato rilevato insieme a grovigli di tau, A $\beta$  intraneuronale, con neuroni e astrociti ma non con la microglia. Riguardo invece ai Kgp, sono stati trovati nella corteccia cerebrale di pazienti con AD, ricordando che questa patologia è anche associata all'atrofia della materia grigia della corteccia cerebrale [93].

Oltre ad offrire la prova che *P. gingivalis* e gingipain nel cervello svolgono un ruolo centrale nella patogenesi dell'AD, viene evidenziata anche la presenza del DNA del batterio e degli antigeni della gingipain nel cervello di AD e dimostrarono in vivo che la somministrazione orale di inibitori della gingipain a piccole molecole, riduce il carico di *P. gingivalis* nel cervello dopo l'infezione orale, blocca la produzione di A $\beta$  1-42, riduce la neuroinfiammazione e salva i neuroni nell'ippocampo di topi di mezza età, il che suggerisce che i gingipain sono i principali

---

<sup>8</sup> L'ubiquitina serve per marcare le proteine obsolete o danneggiate per poi portarle alla distruzione nei proteasomi [95].

driver di AD [94]. È stato anche dimostrato che la carica batterica di *P. gingivalis* può essere rilevata nel liquido cerebrospinale di pazienti con AD clinico, fornendo ulteriori prove di infezione da *P. gingivalis* nel SNC. Ling et al., hanno dimostrato che questo batterio, una volta entrato nel cervello, possa diffondersi lentamente per molti anni da neurone a neurone lungo percorsi anatomicamente collegati, simile a quanto è stato dimostrato per la trasmissione vascolare da cellula a cellula di *P. gingivalis*.

È stato anche suggerito che la patologia tau si diffonda da neurone a neurone, con uno schema simile a un processo infettivo. I dati indicano che la tau è un bersaglio della proteolisi della gingipain, pertanto la patologia della tau osservata nel cervello di AD può essere dovuta alla diffusione transneurone di *P. gingivalis*, in cui si assiste ad un danno diretto della tau indotta dalla proteolisi della gingipain e dall'attivazione della gingipain delle proteasi umane che agisce sulla tau. Studi recenti di Sato et al. nel 2018, studiarono la cinetica della tau nel SNC umano e scoprirono che il tasso di produzione di tau era aumentato nel CSF di soggetti con AD preclinico e clinico. Questi risultati supportano l'ipotesi che i gingipain possano essere un driver di un aumento compensatorio della produzione di tau [93].

Infine, uno studio interessante di Yamasaki et al., individuarono una specie di *Porphyromonas* nota per la produzione di gingipain, ovvero il *Porphyromonas gulae*. Il *P. gulae* è un abitante naturale della cavità orale di animali da compagnia come i cani, e si è dimostrato che i cani possono trasmettere *P. gulae* alla cavità orale dei loro proprietari [96]. Tuttavia sono ancora in corso ricerche per determinare se *P. gulae* possa contribuire al carico di gingipain nel cervello di AD [93].

#### 4.4.2.3. *Porphyromonas gingivalis* e gli inflammasomi

Gli inflammasomi sono stati scoperti nel 2002 dallo studioso Jürg Tschopp e Coll. e vengono definiti come complessi multiproteici intracellulari che si assemblano in risposta a patterns molecolari associati ad agenti patogeni denominati PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), o a un danno cellulare, o tissutale di varia natura denominato DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) in grado di indurre la reazione infiammatoria. I processi attivati dagli inflammasomi hanno grande importanza non solo come risposta antimicrobica, ma anche nel regolare vie metaboliche e reazioni immunitarie. Questi complessi multiproteici si formano a seguito di una condizione di disordine causato da agenti biologici, fisici, chimici, metabolici come ad esempio la presenza della proteina  $\beta$ -amiloide nell'AD. Inoltre i complessi inducono l'attivazione della caspasi-1 infiammatoria che, a sua volta, attiva le citochine come IL-1 $\beta$  e IL-18 che danno luogo ad una risposta infiammatoria sistemica. L'attivazione di caspasi-1 è anche in grado di indurre una forma di morte cellulare infiammatoria denominata piroptosi. Fino ad oggi sono stati identificati diversi tipi di inflammasomi ma quello attualmente più caratterizzato è l'inflammasoma intracellulare NLRP3 (*Nod-Like Receptor Protein 3*). Esso è attivato in risposta a numerosi segnali e gioca un ruolo importante in diverse malattie tra cui la malattia di Alzheimer [97]. Difatti gli studi di Griffin et al., Ojala et al., Cabral e de Lma, hanno mostrato che l'attivazione di NLRP3 nella microglia è associata a senescenza cellulare e AD. Al contrario, è stato segnalato che l'inibizione della caspasi-1 migliora i sintomi dell'AD nei modelli animali, suggerendo un nuovo bersaglio per un possibile trattamento per l'AD [87]. Analogamente altri studi dimostrano l'attivazione di inflammasomi nel cervello di pazienti affetti da AD [98] e che la loro attivazione può essere indotta da *P. gingivalis* [99].

Ricerche recenti indicano che anche la formazione di placche A $\beta$  nell'AD è legata all'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 nella microglia e il rilascio di granuli ASC<sup>9</sup> che guidano l'assemblaggio e la deposizione di A $\beta$  [93]. Huang et al., nel 2009, hanno dimostrato che il batterio induce una morte cellulare simil-necrotica che richiede NLRP3 e ASC ma non le caspasi (compresa la caspasi-1). Le cellule infettate da *P. gingivalis* mostrano caratteristiche morfologicamente indicative di necrosi, inclusa una perdita dell'integrità della membrana e il rilascio del contenuto cellulare. Oltre alla morte cellulare indotta da *P. gingivalis*, si assiste alla formazione di speck ASC<sup>10</sup>, che richiede la presenza di ASC e NLRP3. Questi risultati sono significativi in quanto le cellule monocitiche sono cruciali nella patogenesi della malattia parodontale ed è importante sottolineare che la necrosi indotta da *P. gingivalis* e la formazione di granuli, sono stati osservati nei macrofagi umani primari. Questo è il primo studio a dimostrare che la formazione di speck ASC si verifica particolarmente in risposta a un patogeno microbico, anche se analisi precedenti abbiano dimostrato che l'acido retinoico o la sovraespressione di ASC inducono la formazione di speck ASC. Il complesso speck ASC può essere preso in considerazione come target alternativo per accertare i meccanismi in cui *P. gingivalis* provoca la morte cellulare indotta e individuarlo come possibile bersaglio per la terapia durante l'infezione microbica [100]. Inoltre, studi di Ellis e Kuehn, nel 2010, dimostrarono che le vescicole della membrana esterna (OMV) di *P. gingivalis* arricchiti in gingipain e rilasciati nei tessuti limitrofi, vengono rapidamente interiorizzati nelle cellule di

---

<sup>9</sup> L'ASC (apoptosis-associated speck-like protein with a CARD) è una proteina che favorisce l'apoptosi, ossia il "suicidio" della cellula che l'ha sintetizzata, ma non nelle cellule della microglia. Infatti, una volta rilasciata, la ASC svolge una duplice azione: facilita l'aggregazione in placche delle proteine beta amiloidi e stimola un'ulteriore risposta infiammatoria da parte delle altre cellule della microglia, esattamente come fanno le interleuchine prodotte grazie alla caspasi-1. Questo causa nel cervello uno stato costante di infiammazione di bassa entità che nel tempo può causare danni seri [101].

<sup>10</sup> Un tratto distintivo dell'attivazione dell'inflammasoma è lo speck ASC, una struttura di dimensioni micrometriche formata dalla proteina dell'adattatore dell'inflammasoma ASC (proteina simile allo speck associata all'apoptosi contenente una CARD), che consiste in un dominio pirinico (PYD) e un dominio di reclutamento della caspasi (CARD) [102].

mammifero. Cecil et al. e Fleetwood et al., nel 2017, aggiunsero che gli OMV guidano l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 e la formazione di speck ASC, causando la morte cellulare attraverso piroptosi. Questi studi indicano che *P. gingivalis* nel cervello umano, attraverso il rilascio di OMV arricchiti in gingipain, potrebbe guidare l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, l'aggregazione di speck ASC e la successiva formazione di placche A $\beta$ . Oltre a NLRP3, uno studio di Zhao e Shao, nel 2016, analizzarono la funzione di un altro tipo di inflammasoma, il NLRP1. Lo studio evidenziava che l'inflammasoma NLRP1 nei neuroni può rilevare fattori di virulenza batterica come le proteasi, fungendo da substrato per gli enzimi patogeni. Pertanto i gingipain intraneuronali possono guidare l'attivazione neuronale di NLRP1, con conseguente piroptosi dei neuroni e attivazione della caspasi-1, portando al rilascio delle interleuchine neuroinfiammatorie IL-1 $\beta$  e IL-18 [93].

#### 4.4.2.4. *Porphyromonas gingivalis* e il sistema del complemento nell'AD

Olsen e Singhrao nel 2019, hanno ipotizzato la correlazione tra i difetti genetici della cascata del complemento e il batterio parodontopatogeno *Porphyromonas gingivalis* nella malattia di Alzheimer [103]. Il sistema del complemento, costituito da più di 30 proteine componenti, regolatori e recettori, è definito come un'arma a doppio taglio. Oltre ad essere un'importante difesa immunitaria innata contro le infezioni e un motore dell'infiammazione, se attivato impropriamente ha anche la capacità di causare malattie immunitarie [104, 105] dando origine a malattie come l'AD [105]. Il Genome-Wide Association Studies (GWAS) ha messo in luce l'associazione tra difetti genici di: C1s, CR1, C9 e clusterina e malattia di Alzheimer.

Se il C1s presenta un gene difettoso, viene definito come una proteina inattiva e questo potrebbe determinare una quantità nota di C1 "inattivato", supportando i dati della letteratura che mostrano un'attivazione del complemento incompleta nei cervelli AD.

L'altro gene difettoso correlato all'AD è il CR1, noto anche come recettore C3b/C4b, una glicoproteina transmembrana che funziona per inibire l'attivazione dello stadio della convertasi C3/ C5 complesso enzimatico su cui convergono le tre vie del complemento. Quindi il ruolo di CR1 nella cascata del complemento è fondamentale per l'attivazione dei passaggi successivi nel complemento. Inoltre, CR1 promuove la fagocitosi dei detriti cellulari, delle placche A $\beta$  e l'aderenza degli immunocomplessi agli eritrociti. Singhrao et.al, già nel 1999, hanno dimostrato che il cervello di AD è generalmente carente di CR1. Hajishangallis et al. nel 2011 suggerirono che l'infezione da *P. gingivalis* media la sovversione immunitaria in relazione a CR1. Queste osservazioni indicarono che il *P. gingivalis* sfrutta tutte quelle situazioni di debolezza genetica che vengono riscontrate in un sistema del complemento.

Riguardo al gene C9 difettoso in relazione alla patogenesi dell'AD, non si hanno ancora studi sufficienti per determinare la correlazione con tale patologia. Tuttavia il C9 fa parte del MAC (complesso di attacco delle membrane), responsabile della lisi osmotica delle cellule estranee. Le prime scoperte che collegavano il complemento alle placche A $\beta$ , indicavano che la cascata del complemento attivato non procedeva alla formazione di C9/MAC. Ancora non è stato definito se la causa sia un difetto genetico sottostante nel gene C9 o un'attivazione incompleta della cascata del complemento in presenza di geni attivi. Perciò, se il C9 difettoso ha perso la sua funzionalità, ovvero l'incapacità di uccidere l'agente patogeno, determinerebbe la diffusione di microbi come il *P. gingivalis* nel corpo, grazie anche ad una maggiore permeabilità del BEE negli anziani e nel cervello di AD.

L'ultimo gene difettoso della cascata del complemento che può avere una correlazione con l'AD è la clusterina. La clusterina è una proteina plasmatica che può svolgere un ruolo importante nella regolazione degli stadi C5b7-8 della via del complesso terminale del complemento. Hakobyan et al., nel 2016, hanno osservato un aumento di clusterina nel plasma

nei soggetti con AD, rispetto ai controlli non-AD [103]. Infine, Hong et al. nel 2016, attraverso degli studi in vivo, osservarono che la via classica del complemento viene attivata da A $\beta$  (oligomero) e porta ad un'eccessiva perdita delle sinapsi da parte della microglia [106]. Altri studi osservazionali, molto interessanti, mostrano invece una resistenza a sviluppare AD da parte di alcuni soggetti molto anziani sebbene presentino una notevole quantità di placche A $\beta$  e NFT (tau iperfosforilata legata a grovigli neurofibrillari) nel loro cervello [103]. Kliegel et al. (2004) e Perls et al. (2004), hanno definito questi individui come pazienti aventi una “riserva cognitiva”. Un altro studio, evidenziò un gruppo di pazienti anziani in cui mostravano a livello cerebrale un ampio numero di placche A $\beta$  e NFT senza che l'individuo abbia ricevuto una diagnosi di AD clinica [107, 108]. Perez-Nievas et al. (2013), li definirono pazienti con “cervello resilienti”. In tutti questi lavori si è concluso che la differenza tra soggetti con “riserva cognitiva” e “cervello resiliente”, e quelli con AD, è l'assenza di infiammazione intracerebrale [109]. Questo sottolinea l'importanza ed il ruolo dell'infiammazione cronica, in alcuni individui, nello sviluppo di deficit funzionali [103].

Uno studio ha messo in risalto la capacità di *P. gingivalis* di evadere i meccanismi di azione del complemento attraverso i propri fattori di virulenza: sia l'LPS che gingipain sono in grado di sopprimere la deposizione di opsonine (IgG, C3b, C5b-9) sulla superficie delle cellule batteriche [110]. In particolare, le gingipain non solo distruggono il complemento attraverso la degradazione proteolitica, ma inibiscono anche l'attivazione del complemento legandosi all'inibitore del complemento C4bp. Quando *P. gingivalis* si lega al regolatore del complemento C4bp sulla superficie batterica, il batterio impedisce l'assemblaggio del complesso di attacco della membrana e acquisisce la capacità di regolare la C3 convertasi. Inoltre, è possibile che i gingipain, insieme ai geni difettosi del complemento, siano in grado di promuovere la progressione della malattia causando l'eliminazione inefficace dei detriti

cellulari, che causano a loro volta l'accumulo di A $\beta$  e NFT. Dominy et al., nel 2019, definirono che la proteina tau, associata alle NFT nel cervello di AD, sembra essere un substrato per i gingipain [93].

Per quanto riguarda il collegamento tra *P. gingivalis* e la possibile sovversione di CR1 e clusterina, i dati del GWAS, mostrano un coinvolgimento di CR1 e i difetti del gene della clusterina nell'AD. Poiché *P. gingivalis* ha la capacità di influenzare CR1 e clusterina, questo rafforza il possibile ruolo patogeno di questo batterio nell'AD, almeno attraverso una maggiore attività immunitaria sovversiva. Belstrøm et al., nel 2011, mostrarono che al di fuori del cervello, *P. gingivalis* fissa C3 e aderisce prontamente agli eritrociti tramite CR1, e questo porta a una rapida degradazione di C3 in iC3b, e presumibilmente, C3dg sulla superficie delle cellule eritrocitarie. Ad oggi non ci sono molti studi in merito alla capacità del batterio di resistere all'azione del C9, ma i dati suggeriscono che il batterio ha la capacità di sopprimerne l'attività compromettendone l'assemblaggio per formare il MAC.

Nel complesso possiamo concludere che le ricerche recenti indicano una compromissione intrinseca o estrinseca dell'attivazione del sistema del complemento, nel cervello dei pazienti AD con infezione da *P. gingivalis*. Tuttavia, non esiste ancora una prova definitiva di un legame nell'AD tra i difetti nella cascata del complemento dell'immunità innata e *P. gingivalis* [103].

#### 4.4.2.5. *P. gingivalis* e citrullinazione nell'AD

*Porphyromonas gingivalis* è l'unico batterio Gram-negativo parodontale associato all'uomo che secerne una peptidilarginina deiminasi (PPAD), ovvero un enzima che converte i residui di arginina caricati positivamente, in residui di citrullina neutri all'interno di peptidi e proteine. Ancora non si hanno precise informazioni su quali tessuti cellulari si ha l'espressione dei PPAD di *P. gingivalis*. Inoltre, la peptidilarginina deiminasi è presente anche nell'uomo in cinque

isotipi (PAD 1, 2, 3, 4/5 e 6) con espressione tessuto-specifica. I processi guidati da PPAD o PAD, prendono il nome di citrullinazione. Gli studi stanno cercando di mostrare come il patogeno parodontale *P. gingivalis* e il suo enzima secreto PPAD, possa influire nello sviluppo di malattie autoimmuni e infiammatorie, tra cui l'AD. La citrullinazione delle proteine è essenziale per diversi processi fisiologici come la differenziazione terminale epiteliale, la regolazione dell'espressione genica, l'apoptosi e l'infiammazione. Tuttavia se la citrullinazione è deregolata può determinare danni all'ospite. Un esempio può essere legato alla citrullinazione di C5a.

C5a è una glicoproteina con una serie di residui di arginina che vengono rilasciati dopo l'attivazione del complemento. La funzione di questa glicoproteina è di indurre vasodilatazione e chemiotassi delle cellule infiammatorie nel sito della lesione. Si è notato che alla citrullinazione mediante PPAD, C5a perde questa importante funzione [111]. Difatti la modificazione enzimatica post-traduzionale dei residui di arginina nelle proteine formate come parte della cascata del complemento, sono alcuni dei processi sovversivi dimostrati da *P. gingivalis* [103]. Inoltre si è visto che un'aumentata citrullinazione dei filamenti citoscheletrici e degli enzimi PAD, è riscontrata in numerose patologie tra cui l'AD [111].

Uno studio di Ishigami et al., nel 2015, per dimostrare il coinvolgimento della citrullinazione proteica nella neurodegenerazione umana, hanno esaminato se le proteine citrullinate vengono prodotte durante l'AD. Di queste proteine ne hanno identificate due: vimentina e proteina acida fibrillare gliale (GFAP)<sup>11</sup>. Attraverso lo studio suggeriscono che la GFAP citrullinata assume un ruolo importante nella progressione dell'AD. Inoltre, hanno dimostrato che la PAD2 era presente in estratti ippocampali di AD e cervelli normali, anche se la quantità di PAD2 nel

---

<sup>11</sup> GFAP è la denominazione istologica con la quale viene indicata l'unità proteica essenziale da cui sono costituiti i filamenti intermedi di tipo III degli astrociti [112].

cervello AD era notevolmente maggiore. Perciò l'accumulo e l'attivazione anormale sia di proteine citrullinate che di PAD2 nell'ippocampo di pazienti con AD, hanno un ruolo importante nell'insorgenza e nella progressione dell'AD e le proteine citrullinate possono diventare un utile marker per malattie neurodegenerative umane [113]. Queste stesse proteine possono essere responsabili della produzione di autoanticorpi reattivi nel cervello contribuendo alla patologia cerebrale correlata all'Alzheimer. Lo studio inoltre suggerisce che queste proteine citrullinate e i loro frammenti di degradazione entrino nella circolazione sanguigna e linfatica, ed essere in grado di suscitare una risposta immunitaria che si traduce nella produzione di autoanticorpi. Perciò nella patologia di AD, come in altre malattie neurodegenerative, si assiste all'esposizione cronica del sistema immunitario nei confronti di questi prodotti citrullinati e tutto ciò può anche causare una continua produzione di autoanticorpi [114].

Pertanto, durante i processi neurodegenerativi, l'LPS di *P. gingivalis* e citrullina intatta costituiscono potenziali fattori di danno [111].

#### 4.4.2.6. *P. gingivalis* e l'iperfosforilazione della tau

Nell'AD, oltre alle placche  $\beta$ -amiloidi, troviamo come caratteristica distintiva un accumulo di tau iperfosforilata che causa perdita precoce di sinapsi, disfunzione nel trasporto assonale, danno al citoscheletro e deterioramento cognitivo. La relazione tra *P. gingivalis* e l'iperfosforilazione della tau non è ancora ben chiara. Perciò in uno studio molto recente (2020) Tang et al. hanno analizzato gli effetti e i meccanismi di *P. gingivalis*, sull'iperfosforilazione della tau nell'AD utilizzando come modello sperimentale ratti Sprague-Dawley (SD) selvatici e cellule HT-22<sup>12</sup>. Dopo circa 4 settimane o 12 settimane dall'iniezione di *P. gingivalis*, gli animali mostravano infiammazione sistemica, la neuroinfiammazione e l'iperfosforilazione

---

<sup>12</sup> HT-22 è una linea cellulare dell'ippocampo di topo immortalata subclonata dalla linea cellulare HT-4 [115].

della tau. In particolare erano aumentati sia i livelli di citochine infiammatorie quali l'interleuchina IL-1 $\beta$ , IL-6 e il TNF $\alpha$  nel siero e nell'ippocampo, sia il numero di GFPA negli astrociti [116]. Compatibilmente con questi dati, già nel 2011, Shi et al., dimostrarono che la terapia anti-TNF $\alpha$  riduceva la fosforilazione della tau nel cervello di topo transgenico APP/PS1<sup>13</sup> [117]. Un altro studio nel 2013, di Ghosh et al., mostrarono che la sovraespressione di IL-1 $\beta$ , causava un aumento di tau fosforilata nel cervello di topi transgenici [118].

In questo studio, poiché avevano definito che *P. gingivalis* poteva determinare l'iperfosforilazione della tau e l'infiammazione nel cervello, avevano ipotizzato anche che l'iperfosforilazione della tau poteva essere indotta dalla neuroinfiammazione. Per verificare questa ipotesi, le cellule HT-22 sono state incubate con IL-1 $\beta$ . I risultati affermarono in vitro che IL-1 $\beta$  induce l'iperfosforilazione di tau inibendo l'attività di PP2A nelle cellule HT-22.

Già in uno studio del 2011, di Kitazawa et al., mostrarono che l'inibizione di IL-1 $\beta$ , riduceva i livelli di tau fosforilata. Pertanto, *P. gingivalis* può causare taupatie nel cervello attraverso la somministrazione endovenosa del batterio nei ratti SD [116].

#### 4.4.3 Il ruolo dell'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nell'AD

Fin qui abbiamo trattato il ruolo di *P. gingivalis* nello sviluppo dell'AD. Tuttavia, uno studio ha suggerito il ruolo diretto di un altro batterio implicato nella parodontite, l'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), sull'AD [119].

L'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, è un batterio Gram-negativo anaerobico facoltativo responsabile delle forme precoci e rapidamente progressive di parodontite tanto che, secondo la vecchia classificazione di Armitage 1999, veniva considerato il batterio responsabile della parodontite aggressiva localizzata. I fattori di virulenza di *Aa*, capaci di attivare una

---

<sup>13</sup> I topi APP/PS1, sono topi transgenici che esprimono geni umani mutati che causano l'Alzheimer [120].

risposta dell'ospite, sono principalmente la leucotossina, la CDT (tossina citoletale distendente) l'LPS, molecole leganti le citochine e grande quantità di vescicole della membrana esterna. Il suo LPS è piuttosto speciale in quanto le risposte immunologiche suscitate dall'ospite possono essere utilizzate per classificare (sierotipizzazione) l'identità di virulenza di ciascuno dei suoi ceppi. La sierotipizzazione di *Aa* è caratterizzata da 7 diversi sierotipi che vanno dalla a alla f e si basa sulle differenze strutturali nella parte dell'antigene O di LPS [121].

Lo studio di Díaz-Zúñiga et al., è incentrato sugli effetti dei sierotipi a, b o c di *Aa*, su culture primarie di microglia o cellule ippocampali miste (a differenza degli studi condotti precedentemente su *P. gingivalis* in cui non hanno considerato la variabilità dei diversi antigeni di ciascun sierotipo batterico di *P. gingivalis*).

I ricercatori hanno dimostrato che l'LPS del sierotipo b di *Aa*, è decisamente più immunogenico rispetto all'LPS degli altri sierotipi, e determina la produzione di citochine pro-infiammatorie e l'espressione di TLR-2 e TLR-4 nella microglia o nelle cellule ippocampali miste.

Inoltre nelle cellule ippocampali induce un cambiamento fondamentale nella morfologia con formazione di perline chiare e neuritiche, caratteristica precoce della disfunzione neuronale, che si verifica anche in seguito alle risposte infiammatorie indotte da A $\beta$  che coinvolgono astrociti e microglia. Già nel 2008, Lee et al., dimostrarono che la neuroinfiammazione indotta da LPS potenzia la generazione di A $\beta$ . I risultati ottenuti da questo studio, suggerirono che l'aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie induce le secretasi coinvolte nel primo passaggio della via amiloidogena, determinando un aumento dei livelli di A $\beta$  1-42 prodotti [119]. In conclusione, l'LPS di *Aa*, aumenta la neuroinfiammazione mediante l'attivazione della microglia e il conseguente aumento di citochine pro-infiammatorie e chemochine accoppiato all'accumulo di A $\beta$ 1-42 [66, 71]. Tuttavia è fondamentale sottolineare che questo è uno studio in vitro e tuttora non sono presenti altre ricerche rilevanti che confermino questa teoria. Per

questo motivo, saranno necessari altri studi in vivo per verificare se il batterio *Aa* è effettivamente correlato all'AD [119].



## 5. Il ruolo dell'igienista dentale nella cura di pazienti con AD

Oggigiorno, la cura sulla salute orale dei pazienti con malattia di Alzheimer e disturbi correlati (ADRD), e del loro accesso all'assistenza sanitaria orale, è ancora piena di ostacoli e barriere. Studi di Nunez et al. (2011) e di Marchini et al. (2018), hanno messo in luce alcune difficoltà a livello sociale, come ad esempio la mancanza di rimborsi adeguati per dentisti e igienisti dentali nell'eseguire l'assistenza sanitaria orale a domicilio; oltre a ciò, vi è anche la mancanza di protocolli specifici per la salute orale di questi pazienti da attuare nelle case di cura in cui si ha l'assistenza a lungo termine ed infine l'assenza di istruzione o l'eccessivo sovraccarico e turnover dei caregiver delle case di cura [122, 123].

Questa analisi tuttavia si riferisce a ricerche eseguite negli Stati Uniti. In Italia, non sono presenti studi scientifici o report che trattano questa problematica pur essendo una realtà a tutti nota e il numero di pazienti affetti da Alzheimer in crescita è dovuto anche per l'aumento dell'aspettativa di vita. I pazienti con AD o ADRD, hanno delle caratteristiche ben note che possono influire sulle normali procedure di assistenza sanitaria orale. Infatti i pazienti presentano diverse barriere e una di queste è l'aggressività [124].

Secondo la ricercatrice Rita Jablonski, le persone affette da demenza spesso non sono più in grado di distinguere le situazioni pericolose da quelle che non lo sono e iniziano a mettere in pratica risposte di lotta (quali l'aggressività), di fuga o di blocco a causa del deterioramento di quelle parti del cervello (che controllano la percezione delle minacce e della paura) quali l'amigdala, l'ippocampo e la corteccia cerebrale. Questi ultimi inoltre ricevono e inviano messaggi all'amigdala. La Jablonski ha fatto un interessante paragone spiegando cosa accade nel cervello dei pazienti con Alzheimer: "*Pensiamo all'ippocampo, alla corteccia cerebrale e all'amigdala come essere nel bosco. In una persona con demenza, il percorso nel bosco è bloccato da erbacce e il messaggio della corteccia e dell'ippocampo non può arrivare*

*all'amigdala*". Spesso, quindi, i pazienti con demenza percepiscono una minaccia quando l'odontoiatra o l'igienista, cercano di eseguire una procedura orale [24].

Pertanto, nei confronti di questi pazienti speciali, si ha bisogno di tecniche precise. Ad esempio, come suggerisce il dott. Mario Ghezzi, è consigliabile fare la prima visita nel domicilio della persona, in presenza di un familiare o del caregiver che conosce il paziente e può essere d'aiuto. Infatti oltre all'aggressività, questi pazienti si sentono disorientati ogni volta che vengono portati fuori dalle proprie mura domestiche. Ciò che i professionisti della salute dovrebbero conoscere e saper attuare, è la capacità di relazionarsi, non solo verbalmente ma anche attraverso il corpo e il proprio atteggiamento [125].

Per questo molte strategie si concentrano sulle capacità di empatia che ogni professionista dovrebbe sviluppare per essere d'aiuto a questi pazienti. Alcune di queste strategie comprendono l'approccio attraverso gli occhi, oppure sorridere mentre si interagisce, scherzare o fare gesti teatrali e in particolar modo guidare i pazienti negli atti della loro cura mettendo una mano sulla loro mano [24].

Una volta che si è entrati in empatia con questi pazienti, è fondamentale determinare una diagnosi ed eseguire un trattamento orale prima che l'AD diventi sempre più grave. Purtroppo non sempre è possibile, in quanto nella nostra società non si valuta sufficientemente l'importanza della prevenzione in questi soggetti già affetti da grave patologia. Perciò, quando si è nella fase lieve della patologia in cui la persona è ancora in grado di eseguire la maggior parte delle attività di vita quotidiana (ADL) o è ancora collaborativa, è fortemente consigliato intervenire se presenta patologie del cavo orale. In pratica, una volta che è stata eseguita la prima visita ed identificato lo stato di AD del paziente (blando, moderato o acuto), l'odontoiatra esegue una diagnosi e un piano di trattamento che consideri la natura irreversibile e progressiva della malattia. Al termine degli interventi odontoiatrici che comprendono anche la

partecipazione dell'igienista dentale, viene realizzato il piano di mantenimento che dovrebbe includere un'attenta valutazione delle routine di igiene orale del paziente e delle abitudini alimentari. Nella tabella vengono illustrati i consigli da attuare nella routine di igiene orale e le abitudini alimentari con i rispettivi obiettivi da raggiungere (Tab.2).

<b><i>Consigli per un'igiene orale domiciliare e abitudini alimentari con l'aiuto dei familiari/caregiver</i></b>	<b><i>Obiettivi da raggiungere</i></b>
<i>Utilizzo di spazzolino da denti</i>	Spazzolare almeno due volte al giorno, per almeno 2 minuti, raggiungendo tutte le superfici dentali. Con il progredire della malattia, il paziente avrà bisogno di aiuto per lavarsi i denti.
<i>Utilizzo del filo interdentale o scovolino</i>	Utilizzarlo almeno una volta al giorno. Nelle fasi successive della malattia, solitamente non sarà più possibile utilizzarlo.
<i>Pulizia della protesi (se presente)</i>	Le protesi devono essere spazzolate con l'apposito spazzolino e sapone (consigliato anche il detersivo per piatti) dopo ogni pasto. Durante la notte si consiglia di immergerle in un detergente per protesi.
<i>Dentifrici al fluoro</i>	Utilizzare sempre un dentifricio al fluoro senza prescrizione, a meno che non venga prescritto un dentifricio al fluoro ad alta concentrazione.
<i>Assunzione di zucchero e frequenza</i>	Se possibile, ridurre la quantità e la frequenza di cibi e bevande zuccherati. Consigliato di sostituire lo zucchero con dolcificanti senza calorie.
<i>Assunzione e frequenza di cibi e bevande acide</i>	Ridurre la quantità e la frequenza di queste sostanze. La sostituzione con prodotti non acidi può essere utile.
<i>Visite odontoiatriche (esami periodici, igiene orale professionale)</i>	Ogni 6 mesi con visite più brevi

**Tabella 2.** I consigli da attuare nei pazienti con AD nel piano di mantenimento sia dal punto di vista dell'igiene del cavo orale, che da quello alimentare [124].

Nella fase lieve dell'AD, si consiglia, a livello domiciliare, di assistere il paziente ma non intervenire attivamente, cercando di favorire l'autonomia, ancora presente, nello svolgere l'igiene orale. Il compito del familiare/caregiver è quello di eseguire un'attenta supervisione, ricordando al paziente di eseguire l'igiene orale oppure di mantenere pulite le protesi e rimuoverle prima di andare a letto. In questa fase si suggerisce l'utilizzo di un dentifricio al

fluoro ad alta concentrazione (5000 ppm) due volte al giorno per aiutare a prevenire la carie e di inserire il paziente in un programma di richiamo almeno ogni sei mesi o meno, a seconda dello stato orale di ogni paziente. Mentre, nella fase moderata dell'AD, in cui il paziente ha più difficoltà nell'eseguire le pratiche di igiene orale domiciliare in modo indipendente, è necessario l'intervento del familiare o del caregiver. Infine nella fase acuta, l'igiene orale viene eseguita solo da operatori sanitari [124].

Purtroppo, uno studio recente di Emanuel e Sorensen (2018), ha dimostrato che l'igiene orale non viene valutata quasi mai nei pazienti con demenza nello stato iniziale e questo è il motivo del perché molto spesso si riscontra una cattiva salute orale nei pazienti con AD [126].

Pertanto, la presenza di una famiglia solidale, principalmente nelle prime fasi di AD è uno dei migliori regali per il paziente. Ancora oggi, come è stato accennato in precedenza, non si ha un'adeguata sensibilità riguardo all'importanza della salute orale nei pazienti con questa patologia. L'esperienza clinica ha dimostrato quanto invece sia preziosa la presenza di famiglie motivate ed istruite, in grado di fornire al paziente un'igiene orale domiciliare. Tuttavia, con il progredire della malattia, questi pazienti vengono spesso indirizzati in un istituto di assistenza a lungo termine. Diverse ricerche scientifiche, hanno confermato quanto la salute orale nelle case di riposo sia altamente trascurata e ancora oggi non è stata trovata nessuna soluzione significativa [124].

## 6. Conclusioni

Solo recentemente la ricerca scientifica ha cominciato a mettere in luce la relazione tra la parodontite e la malattia di Alzheimer; sebbene i meccanismi di relazione causa effetto non siano stati ancora ben chiariti, dalla mia ricerca bibliografica sono emersi studi scientifici molto interessanti in merito all'effetto diretto di alcuni batteri sull'accumulo di amiloide e quello indiretto dell'infiammazione cronica sistemica da essi causata a livello neurologico. La prima evidenza è l'importanza della salute del cavo orale e la sua correlazione con la funzione cognitiva: lo studio di Lou et al. (2015), *The Shanghai Aging Study*, riporta un aumento dei batteri parodontopatogeni nei soggetti che perdono diversi elementi dentari. Suggerisce, inoltre, che i pazienti con meno denti, hanno un rischio maggiore di sviluppare la demenza [36]. Anche lo studio più recente di Kobayashi et al. (2018), conferma la stessa ipotesi di Lou e aggiunge che la perdita dei denti, aumenta i rischi di atrofia delle aree cerebrali correlate alla memoria, all'apprendimento e alla cognizione [37]. È stato valutato anche l'impatto della disbiosi del microbioma orale non solo sulle patologie orali, carie e parodontiti, ma anche su patologie sistemiche, in particolar modo quelle correlate al sistema nervoso, tra cui l'AD. Una revisione sistematica di Gao et al., riporta diversi studi già a partire dal 1993, in cui Miklossy et al., notarono spirochete orali e intestinali, nei pazienti con diagnosi di AD. Nel 2009, Kamer et al., valutarono l'aumento nel siero di TNF $\alpha$  e di anticorpi di *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, nei pazienti con AD [58]. Di seguito, nel 2013, Poole et al., trovarono l'LPS di *P. gingivalis* nel cervello con AD, rispetto ai non-AD [86]. Tutto ciò conferma che la disbiosi orale interferisce sullo sviluppo di AD almeno in parte a causa della produzione di elevati livelli di citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6, e TNF $\alpha$  [70] che, attraverso la circolazione sistemica riescono a raggiungere il cervello, innescando un aumento della produzione di A $\beta$  e l'iperfosforilazione della proteina tau, caratteristiche distinte dell'AD.

Anche i batteri orali, virus e lieviti riescono, attraverso la circolazione sistemica, a raggiungere il cervello e determinare principalmente neuroinfiammazione, fosforilazione della proteina tau e deposizione di A $\beta$ . Pertanto, se la disbiosi orale può essere definita come una delle cause dell'insorgenza delle due patologie, potremmo definirla come un ponte che collega la parodontite e l'Alzheimer. Inoltre, gli studi affermano che esiste un rapporto bidirezionale in cui le due malattie si influenzano reciprocamente.

In una revisione sistematica Kamer, Craig, Niederman, Fortea, e De-Leon, (2019), illustrano diversi studi che correlavano il rapporto diretto tra la parodontite con l'AD. Quelli più significativi evidenziano come la parodontite, non trattata negli anni, determini un aumento del rischio di demenza. Inoltre, viene riportato che, in assenza di altri fattori di rischio, la sola parodontite può essere considerata un fattore di rischio per AD [70]. Riguardo alla temporalità, gli studi di Sparks Stein et al., e di Noble et al., hanno dimostrato la presenza di livelli di anticorpi batterici dopo 10 anni dall'insorgenza della parodontite e che ciò può determinare l'insorgenza di uno stato infiammatorio che promuove l'AD [70, 77].

L'approfondimento della ricerca sui batteri parodontopatogeni correlabili all'AD ha fatto emergere il ruolo prevalente di *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* e dei loro fattori di virulenza.

Il *P. gingivalis* innesca moltissimi meccanismi capaci di influenzare l'AD. Quelli più studiati riguardano l'LPS e la gingipain. l'LPS di *P. gingivalis*, è presente nell'ambiente microgliale ed è capace di innescare immunosenescenza legata ad una carenza fagocitosa. Wu, et al. (2017), attraverso uno studio su topi esposti cronicamente a LPS-Pg, hanno dimostrato un aumento di produzione di CatB sia nella microglia che nei neuroni di topi di mezza età che causa deficit di memoria [89]. Un altro studio interessante di Zhang et al., confermava che l'iniezione intraperitoneale di LPS-Pg nei topi determinava compromissione della memoria e

dell'apprendimento con un'attivazione delle cellule gliali nella corteccia e nelle regioni dell'ippocampo del cervello di questi topi con un aumento di citochine [92]. Riguardo alla gingipain, lo studio di Ilverski et al. nel 2018, evidenziarono, dopo l'applicazione orale di *P. gingivalis* in topi giovani adulti, l'immunoreattività della gingipain a livello intra-nucleare, perinucleare ed extracellulare, e sono state osservate infiammazioni cerebrali, neurodegenerazioni e produzione di  $\beta$ -amiloide nell'ippocampo [94]. Anche Dominy et al. (2019), hanno identificato le gingipain nel cervello di pazienti AD e i loro livelli erano anche correlati alla patologia della tau e dell'ubiquitina [93]. Infine, un solo studio di Díaz-Zúñiga et al. (2019), ha approfondito la correlazione di LPS di *A. actinomycetemcomitans* nell'AD. Più precisamente questo studio suggerisce che l'LPS sierotipo b, potrebbe determinare un aumento sia della neuroinfiammazione mediante l'attivazione della microglia. Pertanto gli studi evidenziano l'esistenza di una correlazione tra parodontite e Alzheimer che dovrà essere sempre più approfondita negli anni [119].

Già ora però è evidente che gli igienisti dentali, professionisti della salute, devono essere in grado di approfondire, conoscere, informarsi sulle possibili relazioni tra malattie del cavo orale e la salute sistemica. Per queste ragioni, l'igienista dentale non è solo la figura che ha il compito di eseguire igieni professionali, come spesso la società e la realtà confermano, ma è una figura in grado di approfondire, saper intercettare i fattori di rischio che potrebbero compromettere non solo la salute orale. L'analisi, del ruolo dell'igienista e del mondo odontoiatrico nei confronti di pazienti con diagnosi di AD, riportata nel 5° capitolo, ha messo in luce la scarsa sensibilità dell'assistenza sanitaria orale nei pazienti con AD.

A ragione di questa carenza, occorrerebbe che le figure mediche e professionali, fossero più attive e organizzate in modo da poter istruire e supportare al meglio i familiari o i caregiver che si trovano ad assistere un paziente con AD, informandoli sulle ragioni importanti di un'accurata

igiene orale. Nelle prime fasi di questa malattia, in cui il paziente è ancora in grado di svolgere diverse azioni quotidiane in maniera autonoma, i familiari dovrebbero immediatamente prenotare una visita odontoiatrica in cui gli verrà illustrato il protocollo consigliato da seguire per la prevenzione dell'insorgenza di patologie orali. Analogamente bisognerebbe far capire ai giovani adulti quanto sia importante non trascurare l'igiene quotidiana ed i regolari controlli proprio in virtù del rischio di sviluppare patologie associate alle parodontiti. Partendo da queste semplici considerazioni ho pensato di produrre un dépliant divulgativo ed esplicativo come esempio di semplice sistema di promozione della salute e che potrebbe essere distribuito dagli igienisti negli studi odontoiatrici o dai medici di famiglia (Allegato 1).

In conclusione, grazie alla formazione, noi igienisti dentali possiamo essere d'aiuto nel sensibilizzare la popolazione ad essere più attenta alla cura del cavo orale e nel prevenire ed intercettare tutte quelle patologie, che se non trattate, possono determinare dei danni anche a livello sistemico.

## Bibliografia

1. Lindhe, J. Parodontologia clinica e odontoiatria implantare. 2006. Casa editrice Edi.Ermes.
2. Sanz, M. La nuova classificazione della malattia parodontale. Tratto da AIDI Italia. (2017). <https://www.aiditalia.it/wp-content/uploads/2019/12/Dispensa-malattia-parodontale-0912.pdf>
3. Rathee, M., & Jain, P. Gingivitis. 2020. Tratto da StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557422/>
4. Mehrotra, N. & Singh. S. Periodontitis. Tratto da StatPerarls [Internet]. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541126/>
5. Løe, H., Theilade, E., & Jensen, S. Experimental Gingivitis in Man. Tratto da The Journal of Periodontology. 1965; 36(3):177-187. <https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1902/jop.1965.36.3.177>
6. Gasner, N., & Shure, R. *Periodontal Disease*. Tratto da StatPearls [Internet]. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554590/>
7. Liccardo, D., Cannavo, A., Spagnuolo, G., Ferrara, N., Cittadini, A., Rengo, C., & Rengo., G. Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. Tratto da International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20(6):1414. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6470716/>
8. Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I., Jepsen, S., Kornman, K., . . . Tonetti, M. S. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. Tratto da J. Clin. Periodontol. 2018; 45(20):S1-S8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926489/>
9. Sanz, M., & Tonetti, M. Nuova classificazione della malattia parodontale e perimplantare . Tratto da Zerodonto. 2019. <https://www.zerodonto.com/2019/04/nuova-classificazione-della-malattia-parodontale-e-perimplantare/>
10. SIdP. (s.d.). *SIdP - Società Italiana di Parodontologia*. Tratto da SIdP: <https://www.sidp.it/media/tazz32a.pdf>
11. Malhotra, R., Kapoor, A., Grover, V., & Kaushal, S. Nicotine and periodontal tissues. Tratto da Journal of Indian Society of Periodontology. 2010; 14(1):72-79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2933534/>
12. Neto, J. B., Rosa, E., Pannuti, C. M., & Romito, G. (2012). Smoking and periodontal tissues: a review. Tratto da Brazilian Oral Research. 2012; 26 [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-83242012000700005&lng=en&nrm=iso&tlng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242012000700005&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

13. Guo, W., Zhou, Q., Jia, Y. & Xu, J. Increased Levels of Glycated Hemoglobin A1c and Iron Deficiency Anemia: A Review. *Tratto da Medical Science*. 2019; 25:8371-8378.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6857442/>
14. Bui, F.Q., Silva, C.L.C.A., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J. . . . Ojcius. D.M. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Tratto da Biomedical Journal*. 2019; 42(1):27-35.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468093/>
15. Mensi, M., Scotti, E., Francetti, L., Giargia, M., Latronico, M., Camurati, A., . . . Rotundo. R. Passato, presente e futuro dei coadiuvanti locali e sistemici nel trattamento non chirurgico di perimplantiti e parodontiti: indicazioni e limiti. *Tratto da Dental Cadmos*. 2016. 84(3):000-000.  
[https://iris.unibs.it/retrieve/handle/11379/477203/37475/DC3\\_000-000\\_SPECIALE\\_2%c2%aaB.pdf](https://iris.unibs.it/retrieve/handle/11379/477203/37475/DC3_000-000_SPECIALE_2%c2%aaB.pdf)
16. Tan, O.L., S. S.H., & Razali, M. Commercial Local Pharmacotherapeutics and Adjunctive Agents for Nonsurgical Treatment of Periodontitis: A Contemporary Review of Clinical Efficacies and Challenges. *Tratto da Antibiotics (Basel.)*. 2020; 9(1):11.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7169417/>
17. Frisoni, G. (s.d.). *La malattia di Alzheimer*. *Tratto da Centro Alzheimer*: <https://www.centroalzheimer.org/area-familiari/la-malattia-di-alzheimer/malattia-di-alzheimer/cose-lalzheimer/>
18. Vasic, V., Barth, K., & Schmidt, M. *Neurodegeneration and Neuro-Regeneration—Alzheimer’s Disease and Stem Cell Therapy*. *Tratto da International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(17):4272.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6747457/>
19. Taylor, C., Greenlund, S., McGuire, L., Lu, h., & Croft, J. *Deaths From Alzheimer's Disease - United States, 1999-2014*. *Tratto da MMWR*. 2017; 66(20):521-526.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28542120/>
20. Hansen, D., Hanson, J., & Sheng, M. *Microglia in Alzheimer’s disease*. *Tratto da Journal of Cell Biology*. 2018; 217(2):459-472.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5800817/>
21. Sochocka, M., Zwolińska, K., & Leszek, J. The Infectious Etiology of Alzheimer’s Disease. *Tratto da Current Neuropharmacology*. 2017; 15(7):996-1009.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5652018/>
22. Salute, M. d. La malattia di Alzheimer comporta un progressivo decadimento delle funzioni cognitive, a cominciare dalla memoria. *Tratto da Ministero della Salute*. 2019.  
[http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1\\_5.jsp?lingua=italiano&id=171&area=Malattie\\_d el\\_sistema\\_nervoso](http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1_5.jsp?lingua=italiano&id=171&area=Malattie_d el_sistema_nervoso)

23. Bondi, M., Edmonds, E., & Salmon, D. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. Tratto da *J. Int. Neuropsychol Soc.* 2017; 23(9-10):818-831.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5830188/>
24. Associazione Alzheimer onlus. L'igiene orale nei malati di demenza. Tratto da Associazione Alzheimer onlus. 2011. <https://www.alzheimer-riese.it/contributi-dal-mondo/ricerche/749-ligiene-orale-nei-malati-di-demenza>
25. Bulgart, H., Neczypor, E., Wold, L., & Mackos, A. Microbial involvement in Alzheimer disease development and progression. Tratto da *Molecular Neurodegeneration.* 2020; 15:42.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7382139/>
26. Sureda, A., Daglia, M., Castilla, S., Sanadgol, N., Nabavi, S., Khan, H., . . . Nabavi, S. *Oral microbiota and Alzheimer's disease: Do all roads lead to Rome?* Tratto da *Pharmacological Research.* 2020; 151: 104582.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661819324831>
27. Palmieri, L., Censi, F., Lo Noce, C., Minutoli, D., & Calcagnini, G. *Rischio cardiovascolare.* Tratto da *ISS e malattia di Alzheimer: prevenzione oltre la diagnosi.* 2019.  
<https://demenze.iss.it/wp-content/uploads/2019/05/Guida-agli-stand.pdf>
28. Crous-Bou, M., Minguillón, C., Gramunt, N. & Molinuevo, J.L. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. Tratto da *Alzheimer's Research & Therapy.* 2017; 9:71.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5596480/>
29. Huang, L.K., Chao, S.P. & Hu, C.J. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. Tratto da *Journal of Biomedical Science.* 2020; 27:18.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943903/>
30. Rusek, M., Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M. & Czuczwar, S.J. Ketogenic Diet in Alzheimer's Disease. Tratto da *International Journal of Molecular Sciences.* 2019; 20(16):3892.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6720297/>
31. Liegro, C., G.Schiera, P.Proia, & Liegro, I. Physical Activity and Brain Health. Tratto da *Genes.* 2019; 10(9):720.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6770965/>
32. Gronek, P., Balko, S., Gronek, J., Zajac, A., Maszczyk, A., Celka, R. . . . Yu, F. Physical Activity and Alzheimer's Disease: A Narrative Review. Tratto da *Aging and Disease.* 2019; 10(6):1282-1292.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6844593/>
33. Ahn, K.C., Learman, C.R., Baker, G., Weaver, C.L., Chung, P.S., Kim, H.G. & Song, M.S. Regulation of Diabetes: A Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease? Tratto da *Journal of Korean Medical Science.* 2019; 34(46):e297  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6882941/>

34. Orr, M., Reveles, K., Yeh, C., Young, E., & Han, X. Can oral health and oral-derived bio-specimens predict progression of dementia? *Tratto da Oral Disease*. 2020; 26(2):249-258.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7031023/>
35. Kossioni, A. The Association of Poor Oral Health Parameters with Malnutrition in Older Adults: A Review Considering the Potential Implications for Cognitive Impairment. *Tratto da Nutrients*. 2018; 10(11):1709  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6266396/>
36. Lou, J., Wu, B., Zhao, Q., Guo, Q., Meng, H., Yu, L., . . . Ding, D. Association between Tooth Loss and Cognitive Function among 3063 Chinese Older Adults: A Community-Based Study. *Tratto da Plos One*. 2015; 10(3):e0120986.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4372206/>
37. Kobayashi, T., Kubota, M., Takahashi, T., Nakasato, A., Nomura, T., Furuya, J., & Kondo, H. Effects of tooth loss on brain structure: a voxel-based morphometry study. *Tratto da Comparative Study*. 2018; 62(3):337-341.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29475808/>
38. Miquel, S., Aspiras, M., & Day, J. Does reduced mastication influence cognitive and systemic health during aging? *Tratto da Physiology & behavior*. 2018; 188:239-250.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29452151/>
39. Thurston, G. (2017). Outdoor Air Pollution: Sources, Atmospheric Transport, and Human Health Effects. *Tratto da International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*. 2017; p.367-377.  
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/volatile-organic-compound>
40. Phillips, M., Cataneo, R., Cheema, T., & Greenberg, J. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Tratto da Clinica Chimica Acta*. 2004; 344(1-2):189-194.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898104001123?via%3Dihub>
41. Probert, C., Ahmed, I., Khalid, T., Johnson, E., Smith, S., & Ratcliffe, N. Volatile organic compounds as diagnostic biomarkers in gastrointestinal and liver diseases. *Tratto da Journal of gastrointestinal and liver diseases: JGLD*. 2009; 18(3):337-43.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19795029/>
42. Hakim, M., Broza, Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., & Haick, H. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Tratto da Chemical reviews*. 2012; 112(11):5949-66.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22991938/>
43. Phillips, M., Cataneo, R., Saunders, C., Hope, P., Schmitt, P., & Wai, J. Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer. *Tratto da Comparative Study*. 2010; 4(2):026003.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21383471/>

44. Ren, Y., Qu, Z., Du, Y., Xu, R., Ma, D., Yang, G., . . . Chang, J. Air quality and health effects of biogenic volatile organic compounds emissions from urban green spaces and the mitigation strategies. *Tratto da Environmental pollution*. 2017; 230:849-861.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28734266/>
45. Mazzatenta, A., Pokorski, M., Sartucci, F., Domenici, L., & Giulio, C. D. Volatile organic compounds (VOCs) fingerprint of Alzheimer's disease. *Tratto da Respiratory physiology & nerutobiology*. 2015; 209:81-4.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25308706/>
46. Farah, R., Haraty, H., Salame, Z., Fares, Y., Ojcius, D., & Sadier, N. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. *Tratto da Biomedical Journal*. 2018; 41(2):63-87.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6138769/>
47. Solbiati, J., & Lopez, J. Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. *Tratto da Journal of Dental Research*. 2018; 97(5):492-500.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5958373/>
48. Lamont, R., Koo, H., & Hajishangallis, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Tratto da Nat. Rev. Microbiol*. 2018; 16(12):745-759.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6278837/>
49. Willis, J., & Gabaldón, T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Tratto da Microorganisms*. 2020; 8(2):308.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7074908/>
50. Wikipedia. Disbiosi. *Tratto da Wikipedia*. 2020.  
[https://it.wikipedia.org/wiki/Disbiosi#:~:text=Per%20disbiosi%20\(conosciuta%20anche%20come,condizione%20inerente%20al%20tratto%20digestivo.](https://it.wikipedia.org/wiki/Disbiosi#:~:text=Per%20disbiosi%20(conosciuta%20anche%20come,condizione%20inerente%20al%20tratto%20digestivo.)
51. Graves, D., Corrêa, J., & Silva, T. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *Tratto da Journal of Dental Research*. 2019. 98(2):148-156.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6761737/>
52. Salute, M. d. Carie. *Tratto da Ministero della Salute*. 2016.  
[http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=724&area=Sorriso%20salute&menu=patologie](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=724&area=Sorriso%20salute&menu=patologie)
53. Rathee, M., & Sapra, A. Dental Caries. 2020. *Tratto da StatPearls [Internet]*.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551699/>
54. Wikipedia. Streptococcus mutans. *Tratto da Wikipedia*. 2019.  
[https://it.wikipedia.org/wiki/Streptococcus\\_mutans](https://it.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_mutans)
55. Wikipedia. Lactobacillus. *Tratto da Wikipedia*. 2020.  
<https://it.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus>

56. Costalonga, M., & Herzberg, M. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Tratto da Immunol Lett.* 2014; 162(2A):22-38.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346134/>
57. Huang, J., Cai, X., Ou, Y., Zhou, Y., & Wang, Y. Resolution of inflammation in periodontitis: a review. *Tratto da International Journal of Clinical & Experimental Pathology.* 2018; 11(9):4283-4295.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6962983/>
58. Gao, L., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y., & Chen, F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Tratto da Protein & Cell.* 2018; 9(5):488-500.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5960472/>
59. ISSalute. Arteriosclerosi. *Tratto da ISSalute.* 2020.  
<https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/a/arteriosclerosi>
60. Wikipedia. 16S ribosomal RNA. *Tratto da Wikipedia.* 2020.  
[https://en.wikipedia.org/wiki/16S\\_ribosomal\\_RNA](https://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RNA)
61. Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fåk, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., . . . Bäckhed, F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Tratto da Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011; 108(1):4592-4598.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3063583/>
62. De-Luca, F., & Shoenfeld, Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Tratto da Clin Exp Immunol.* 2019; 195(1):74-85.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6300652/>
63. Salute, M. d. Sindrome dell'ovaio policistico. *Tratto da Ministero della Salute.* 2019.  
<http://www.salute.gov.it/portale/donna/dettaglioContenutiDonna.jsp?lingua=italiano&id=4488&area=Salute%20donna&menu=patologie>
64. ISSalute. MICI - Malattie infiammatorie croniche dell'intestino. *Tratto da ISSalute.* 2018.  
<https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/m/mici-malattie-infiammatorie-croniche-dell-intestino>
65. ISSalute. Cirrosi epatica. *Tratto da ISSalute.* 2018.  
<https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/c/cirrosi-epatica#introduzione>
66. Dioguardi, M., Crincoli, V., Laino, L., Alovisi, M., Sovereto, D., Mastrangelo, F., . . . Lo-Muzio, L. The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Tratto da J Clin Med.* 2020; 9(2):495.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7074205/>
67. Ding, Y., Ran, J., Yu, H., Yu, W., & Zhou, Y. Porphyromonas gingivalis, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Tratto da Immun Ageing.* 2018; 30(15):6.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29422938/>

68. Guzman-Martinez, L., Maccioni, R., Andrade, V., Navarrete, L., Pastor, M., & Ramos-Esco-bar, N. Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. *Tratto da Frontiers in Pharmacology*. 2019; 10:1008.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6751310/>
69. Wikipedia. Calcineurina. *Tratto da Wikipedia*. 2020.  
<https://it.wikipedia.org/wiki/Calcineurina>
70. Kamer, A., Craig, R., Niederman, R., Fortea, J., & de-Leon, M. Periodontal disease as a possible cause for Alzheimer's disease. *Tratto da Periodontology 2000*. 2020; 83(1):242-271.  
[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/prd.12327?casa\\_token=3BZ9yEdnlqUAAAAA%3AlqpQbqNFn0aa2uSMRwK46Ig-biGdEW77JGjAB7\\_bNbPV0G6LNNaoFNz\\_mUxDHjKezV78z0ZuLVz3JA](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/prd.12327?casa_token=3BZ9yEdnlqUAAAAA%3AlqpQbqNFn0aa2uSMRwK46Ig-biGdEW77JGjAB7_bNbPV0G6LNNaoFNz_mUxDHjKezV78z0ZuLVz3JA)
71. Liccardo, D., Marzano, F., Carraturo, F., Femminella, M. G., Bencivenga, L., Agrimi, J., . . Cannavo, A. Potential Bidirectional Relationship Between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *Tratto da Frontiers in Physiology*. 2020; 11:683.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7348667/>
72. Wells, G., Shea, B., O'Connell, D., Peterson, J., Welch, V., Losos, K., & Tugwell, P. (s.d.). The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. *Tratto da The Ottawa Hospital*. 2019.  
[http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp)
73. Wikipedia. Bradford Hill criteria. *Tratto da Wikipedia*. 2020.  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Bradford\\_Hill\\_criteria](https://en.wikipedia.org/wiki/Bradford_Hill_criteria)
74. Lee, Y., Hu, H., Huang, L., Chou, P., & Chu, D. Periodontal Disease Associated with Higher Risk of Dementia: Population-Based Cohort Study in Taiwan. *Tratto da Journal of the American Geriatrics Society*. 2017; 65(9):1975-1980.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jgs.14944>
75. Choi, S., Kim, K., Chang, J., Kim, S., Kim, S., Cho, H., & Park, S. Association of Chronic Periodontitis on Alzheimer's Disease or Vascular Dementia. *Tratto da Journal of the American Geriatrics Society*. 2019; 67:6.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jgs.15828>
76. Chen, C., Wu, Y., & Chang, Y. Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study. *Tratto da Alzheimer's Research & Therapy*. 2017; 9(1):56.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28784164/>
77. Sparks Stein, P., Steffen, M., Smith, C., Jicha, G., Ebersole, J., Abner, E., & Dawson, D. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Tratto da Alzheimer's Dement*. 2012; 8(3):196-203.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3712346/>

78. Poole, S., Singh Rao, S., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I., Kesavalu, L., & Crean, S. Active Invasion of *Porphyromonas gingivalis* and Infection-Induced Complement Activation in ApoE<sup>-/-</sup> Mice Brains. *Tratto da Journal of Alzheimer's Disease*. 2014; 43(1):67-80. <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad140315>
79. Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K., & Wagner, D. ApoE deficiency leads to a progressive age-dependent blood-brain barrier leakage. *Tratto da American Journal of physiology. Cell physiology*. 2007; 292(4):C1256-62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16870825/>
80. Teixeira, F., Saito, M., Matheus, F., Prediger, R., Yamada, E., Maia, C., & Lima, R. Periodontitis and Alzheimer's Disease: A Possible Comorbidity between Oral Chronic Inflammatory Condition and Neuroinflammation. *Tratto da Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017; 9:327. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5649154/#B45>
81. Sparks Stein, P., Desrosiers, M., Donegan, S., Yepes, J., & Kryscio, R. Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun study. *Tratto da Journal of the American Dental Association*. 2007; 138(19):1314-22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17908844/>
82. Wikipedia. Nun Study. *Tratto da Wikipedia*. 2020. [https://en.wikipedia.org/wiki/Nun\\_Study](https://en.wikipedia.org/wiki/Nun_Study)
83. How, K., Song, K., & Chan, K. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Tratto da Frontiers in Microbiology*. 2016; 7:53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746253/>
84. Matsushita, K., Yamada-Furukawa, M., Kurosawa, M., & Shikama, Y. Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Tratto da Journal of inflammation research*. 2020; 13:275-283. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32636667/>
85. Olsen, I., & Singh Rao, S. *Porphyromonas gingivalis* infection may contribute to systemic and intracerebral amyloid-beta: implications for Alzheimer's disease onset. *Tratto da Journal Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2020. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14787210.2020.1792292>
86. Poole, S., Singh Rao, S., Kesavalu, L., Curtis, M., & Crean, S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Tratto da Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2013; 36(4):665-77. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23666172/>
87. Osorio, C., Kanukuntla, T., Diaz, E., Jafri, N., Cummings, M., & Sfera, A. The Post-amyloid Era in Alzheimer's Disease: Trust Your Gut Feeling. *Tratto da Frontiers in Aging Neuroscience*. 2019; 11:143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6608545/>

88. De-Simone, R., Ajmone-Cat, M., Bernardo, A., De-Nuccio, C., & Greco, A. La Microglia: scultore e guardiano del cervello. Tratto da ISS- scuola e ricerca. 2018. [https://scuolaericerca.iss.it/wp-content/uploads/2018/12/BC25\\_2018.pdf](https://scuolaericerca.iss.it/wp-content/uploads/2018/12/BC25_2018.pdf)
89. Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J., Takayama, F., Collcutt, A., . . . Nakanishi, H. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. Tratto da Brain Behavior, and Immunity. 2017; 65:350-361. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117301897?via%3Dihub#s0010>
90. Olsen, I., & Singhrao, S. Importance of heterogeneity in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A in tissue specific inflammatory signalling. Tratto da Journal of Oral Microbiology. 2018; 10(1):1440128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5827638/>
91. Pålsson-McDermott, E., & O'Neill, L. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Tratto da Immunology. 2004; 113(2):153-162. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782563/>
92. Singhrao, S., & Olsen, I. Assessing the role of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis to determine a causative relationship with Alzheimer's disease. Tratto da Journal of Oral Microbiology. 2019; 11(1):1563405. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6352933/>
93. Dominy, S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyc, A., Konradi, A., . . . Walker, G. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. Tratto da Science Advances. 2019; 5(1):eaau3333. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6357742/>
94. Nonaka, S., & Nakanishi, H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* induce microglia migration through endosomal signaling by protease-activated receptor 2. Tratto da Neurochemistry International. 2020; 140:104840. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019701862030231X?via%3Dihub#bib18>
95. Goodsell, D. Ubiquitina. Tratto da PDB - Protein data bank. 2004. [https://www.pianetachimica.it/mol\\_mese/mol\\_mese\\_2004/12\\_Ubiquitina/Ubiquitina\\_1\\_ita.htm](https://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2004/12_Ubiquitina/Ubiquitina_1_ita.htm)
96. Yamasaki, Y., Nomura, R., Nakano, K., Naka, S., Matsuomoto-Nakano, M., Asai, F., & Ooshima, T. Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. Tratto da Comparative Study. 2012; 57(9):1183-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22417880/>
97. Benelli, R. Gli inflammasomi. Tratto da LILT Prato. 2019. <https://legatumoriprato.it/wp-content/uploads/2019/07/INFLAMMASOMI-OPUSCOLO-17X24-8-LUGLIO.pdf>

98. Saresella, M., LaRosa, F., Piancone, F., Zoppis, M., Marventano, I., Calabrese, E., . . . Clerici, M. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Tratto da Molecular Neurodegeneration*. 2016. 11:23.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4778358/>
99. Olsen, I., & Yilmaz, O. Modulation of inflammasome activity by *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis and associated systemic diseases. *Tratto da Journal of Oral Microbiology*. 2016; 8: 10.3402/jom.v8.30385.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4744328/>
100. Huang, M., Taxman, D., Holley-Guthrie, E., Moore, C., Willingham, S., Madden, V., . . . Ting, J. Critical Role of Apoptotic Speck Protein Containing a Caspase Recruitment Domain (ASC) and NLRP3 in Causing Necrosis and ASC Speck Formation Induced by *Porphyromonas gingivalis* in Human Cells. *Tratto da The Journal of Immunology*. 2009; 182(4):2395-2404.  
<https://www.jimmunol.org/content/182/4/2395.long>
101. Scienze, L. Il ruolo dell'infiammazione nell'Alzheimer. *Tratto da Le Scienze*. 2017.  
[https://www.lescienze.it/news/2017/12/22/news/il ruoo o dell infiammazione nell alzheimer-3800936/](https://www.lescienze.it/news/2017/12/22/news/il_ruolo_dell_infi ammazione_nell_alzheimer-3800936/)
102. Dick, M., Sborgi, L., Rühl, S., Hiller, S., & Broz., P. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Tratto da Nat Commun*. 2016; 22(7):11929.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27329339/>
103. Olsen, I., & Singhrao, S. Is there a link between genetic defects in the complement cascade and *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease? *Tratto da Journal of Oral Microbiology*. 2020; 12(1):1676486.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6818111/#CIT0025>
104. Bardhan, M., & Kaushik, R. Physiology, Complement Cascade. *Tratto da StatPearls [Internet]*. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551511/>
105. Morgan, B., & Harris, C. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Tratto da Nature Public Health Emergency Collection*. 2015; 14(12):857-877.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7098197/>
106. Hong, S., Beja-Glasser, V., Nfonoyim, B., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., . . . Stevens, B. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Tratto da Science*. 2016; 352(6286): 712-716  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5094372/>
107. Kliegel, M., Moor, C., & Rott, C. Cognitive status and development in the oldest old: a longitudinal analysis from the Heidelberg Centenarian Study. *Tratto da Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2004; 39(2):143-156.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167494304000111?via%3Dihub>

108. Perls, T. Centenarians who avoid dementia. *Tratto da Trends in Neurosciences*. 2004; 27(10):633-636.  
[https://www.cell.com/trends/neurosciences/fulltext/S0166-2236\(04\)00240-1?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0166223604002401%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/neurosciences/fulltext/S0166-2236(04)00240-1?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0166223604002401%3Fshowall%3Dtrue)
109. Perez-Nievas, B., Stein, T., Tai, H., Dols-Icardo, O., Scotton, T., Barroeta-Espar, I., . . . Klunk, W. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Tratto da Brain*. 2013; 136(8):2510-2526.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3722351/>
110. Hajishengallis, G., Abe, T., Maekawa, T., Hajishengallis, E., & Lambris, J. Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium. *Tratto da Semin. Immunol.* 2013; 25(1):65-72.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3706506/>
111. Olsen, I., Singhrao, S., & Potempa, J. Citrullination as a plausible link to periodontitis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Tratto da Journal of Oral Microbiology*. 2018; 10(1):1487742.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6022223/#CIT0058>
112. Wikipedia. Proteina fibrillare acida della glia. *Tratto da Wikipedia*. 2020.  
[https://it.wikipedia.org/wiki/Proteina\\_fibrillare\\_acida\\_della\\_glia](https://it.wikipedia.org/wiki/Proteina_fibrillare_acida_della_glia)
113. Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., . . . Maruyama, N. Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *Tratto da Journal of Neuroscience Research*. 80(1):120-128.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.20431>
114. Acharya, N., Nagele, E., Han, M., Coretti, N., DeMarshall, C., Kosciuk, M., . . . Nagele, R. Neuronal PAD4 expression and protein citrullination: Possible role in production of autoantibodies associated with neurodegenerative disease. *Tratto da Journal of Autoimmunity*. 2012; 38(4):369-380.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896841112000431?via%3Dihub>
115. Studies, T. S. (s.d.). HT-22 Mouse Hippocampal Neuronal Cell Line. *Tratto da Merck*.  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/scc129?lang=it&region=IT>
116. Tang, Z., Liang, D., Cheng, M., Su, X., Liu, R., Zhang, Y., & Wu, H. Effects of Porphyromonas gingivalis and Its Underlying Mechanisms on Alzheimer-Like Tau Hyperphosphorylation in Sprague-Dawley Rats. *Tratto da Journal of Molecular Neuroscience*. 2020.  
<https://doi.org/10.1007/s12031-020-01629-1>
117. Shi, J., Shen, W., Chen, J., Wang, B., Zhong, L., Zhu, Y., . . . Xu, J. Anti-TNF- $\alpha$  reduces amyloid plaques and tau phosphorylation and induces CD11c-positive dendritic-like cell in the APP/PS1 transgenic mouse brains. *Tratto da Brain Research*. 2011; 1368:239-247.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000689931002322X?via%3Dihub>

118. Ghosh, S., Wu, M., Shaftel, S., Krykanides, S., LaFerla, F., Olschowka, J., & O'Banion, M. Sustained Interleukin-1 $\beta$  Overexpression Exacerbates Tau Pathology Despite Reduced Amyloid Burden in an Alzheimer's Mouse Model. *Tratto da The Journal of Neuroscience*. 2013; 33(11):5053-5064  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637949/>
119. Díaz-Zúñiga, J., Muñoz, Y., Melgar-Rodríguez, S., More, J., Bruna, B., Lobos, P., . . . Paula-Lima, A. Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* triggers pro-inflammatory responses and amyloid beta secretion in hippocampal cells: a novel link between periodontitis and Alzheimer's disease? *Tratto da Journal of oral Microbiology*. 2019; 11(1):1586423.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6484476/#CIT0044>
120. Medi Magazine. Farmaco per il diabete “inverte significativamente la perdita di memoria” nei topi con Alzheimer. *Tratto da MediMagazine*. 2018.  
<https://www.medimagazine.it/farmaco-diabete-inverte-significativamente-la-perdita-memoria-nei-topi-alzheimer/>
121. Belibasakis, G., Maula, T., Bao, K., Lindholm, M., Bostanci, N., Oscarsson, J., . . . Johansson, A. Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Tratto da Pathogens*. 2019; 8(4):222.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6963787/>
122. Marchini, L., Recker, E., Hartshorn, J., Cowen, H., Lynch, D., Drake, D., . . . Caplan, D. Iowa Nursing Facility Oral Hygiene (INFOH) Intervention: A Clinical and Microbiological Pilot Randomized Trial. *Tratto da Spec. Care Dentist*. 2018; 38(6):345-355.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6246798/>
123. Nunez, B., Chalmers, J., Warren, J., Ettinger, R., & Qian, F. Opinions on the provision of dental care in Iowa nursing homes. *Tratto da Spec. Care Dentis*. 2011; 31(1):33-40.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075850/>
124. Marchini, L., Ettinger, R., Caprio, T., & Jucan, A. Oral health care for patients with Alzheimer's disease: An update. *Tratto da Special Care in Dentistry*. 2019; 39(3):262-273.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/scd.12375>
125. Il dentista moderno. I malati di Alzheimer, quasi dimenticati dagli odontoiatri. *Tratto da Il dentista moderno*. 2018.  
<https://www.ildentistamoderno.com/assistenza-odontoiatrica-per-malati-di-alzheimer/>
126. Emanuel, R., & Sorensen, A. A study of oral health prevention behaviours for patients with early stage dementia. *Tratto da British Dental Journal*. 2018; 224:38-42.  
<https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2018.5>



# Allegati

## Allegato 1 – Dépliant

### L'IGIENE ORALE !

-  Vai dal tuo igienista dentale! Ti spiegherà come e cosa utilizzare per una corretta igiene orale.
-  Lavati i denti dopo ogni pasto per almeno due minuti.
-  Usa anche il filo interdentale o gli scovolini per pulire bene gli spazi tra i denti.
-  Se hai le protesi rimovibili, ricordati di toglierle e pulirle dopo aver mangiato.
-  Fai un controllo dal tuo dentista e dal tuo igienista dentale almeno una volta all'anno.


a cura di  
**Claudia Duranti**

con il supporto e la supervisione della  
**Prof.ssa Maria Rita Rippo**

ideazione e realizzazione grafica 

### Lo sai che..




### ..c'è un legame tra ALZHEIMER e PARODONTITE ?

### CHE COS'È LA PARODONTITE ?



La parodontite è una malattia infiammatoria cronica causata da tanti fattori. La principale causa sono i batteri che si nascondono nella placca dentale (pellicola appiccicosa che si forma sulla superficie dei denti). Se la placca dentale non viene rimossa, attraverso le procedure di igiene orale, si trasforma in tartaro e i batteri, contenuti in esso, sono capaci di distruggere tutto ciò che circonda il dente causandone la perdita.

**Dente sano**



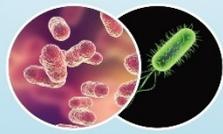
**Parodontite**



### CHE RELAZIONE C'È TRA PARODONTITE E ALZHEIMER ?




**Si influenzano reciprocamente!** Nella bocca, quando non si esegue una buona igiene orale, aumentano i batteri cattivi, a scapito di quelli buoni e si ha la **disbiosi orale**. Tra i batteri dannosi nella disbiosi, **Porphyromonas gingivalis** e **Aggregatibacter actinomycetemcomitans** non solo causano la parodontite ma sono fattori di rischio per l'Alzheimer.



### QUALI CONSIGLI PER RALLENTARE LA MALATTIA ?

La salute orale è importante per prevenire e controllare l'evoluzione, oltre che dell'Alzheimer anche di patologie sistemiche (diabete, artrite reumatoide, malattie cardiovascolari). **I pazienti non autosufficienti, come quelli affetti da Alzheimer, hanno bisogno di aiuto per mantenere la propria igiene orale.**

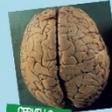


Se sei un familiare o una persona che si prende cura di un soggetto nelle prime fasi della malattia, non aspettare! **Fagli fare subito un controllo odontoiatrico finché il soggetto è collaborativo!** L'igienista dentale saprà darti i migliori consigli per aiutare ed assistere i malati di Alzheimer nella cura dell'igiene orale.

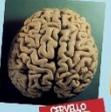


### CHE COS'È L'ALZHEIMER ?

È una malattia neurodegenerativa causata da diversi fattori. Recenti studi hanno individuato che **una scarsa igiene orale può essere un fattore di rischio** per l'Alzheimer.



**CERVELLO SANO**



**CERVELLO ALZHEIMER**

Il cervello si rimpicciolisce e vengono danneggiate le zone legate al RICORDO.



## Ringraziamenti

“Io ho un sogno... e voglio raggiungerlo!”

Così è iniziato il cammino verso questa scelta e questo percorso così faticoso ma in cui ora voglio gustarmi il traguardo. Tutto è nato nei banchi di scuola, durante il quarto superiore, in cui a breve mi avrebbero definito una ragioniera, futura economista, banchiera o commercialista. In quei banchi di scuola è nato il mio desiderio, quello di diventare un giorno un'igienista dentale.

In questi anni le persone da ringraziare sono tante ma in primis voglio dire un grande grazie alla mia famiglia, così imperfetta ma tanto importante per me. Nei momenti più faticosi della mia vita ma anche in questo percorso universitario ha saputo starmi accanto, assicurandomi quando tutto sembrava così difficile e festeggiare insieme quando un piccolo ma grande traguardo riuscivo a raggiungere. Ringrazio la mia mamma per tutti i sacrifici che ha fatto, non posso immaginare la fatica che fa, ma questo traguardo lo dedico anche a lei! Siamo così diverse che litighiamo ogni giorno, ma pur sempre legate da un Amore più grande. Grazia a Zia Dona per avermi trasmesso la grinta di raggiungere i propri sogni, di dirmi sempre che potevo farcela e di credere in me stessa!

Ringrazio Gioele, la persona che Dio ha voluto mettermi a fianco. Nei momenti di fragilità mi ha preso per mano e anche grazie a lui sono riuscita a guardare un po' oltre la mia ansia, dandomi la speranza che c'è sempre un orizzonte da guardare, un volto di speranza da scoprire.

Ringrazio i miei amici e in particolare quelli dalle “relazioni profonde”. Grazie per avermi sostenuto, accompagnato, custodito in questi anni e nella mia vita.

In particolare ringrazio Eleonora, con la sua teoria dell'elefante mi ha insegnato a saper attendere, saper gustare le piccole prove che mi attendevano e ricordandomi sempre che “se l'elefante lo guardi tutto insieme ti spaventa, se guardi prima la sua orecchia, poi la sua gamba,

la sua bocca tutto ti sembrerà meno spaventoso!”. Grazie Ele, questa teoria mi è stata di grande aiuto per guardare in faccia la mia ansia a piccoli bocconi.

Ringrazio Gianmaria, per essermi accanto come amico nella vita. Mi ricordi sempre quanto sia prezioso camminare, quanto siano importanti le cadute e quanto bello sia rialzarsi. Quando avevo deciso di rimettermi a studiare e quando poi concretamente ero stata presa all’università, lasciare il lavoro e le mie sicurezze non è stato facile. Come amico hai saputo accogliere le mie lacrime, paure, fatiche, ricordandomi che nonostante tutto, ero amabile lo stesso.

Ringrazio i miei Giovanissimi di Azione Cattolica. A loro va un grandissimo grazie per avermi, senza saperlo, tirato su il morale quando non ne avevo proprio voglia. Siete stati importanti non solo nella mia vita ma anche in questo percorso universitario. Mi avete ricordato che la vera felicità non è prendere un voto alto all’esame o far successo o essere agli occhi degli altri “la ragazza che studia sempre”. La vera felicità parte dalle relazioni. Senza relazioni siamo vuoti, siamo fatti per Amare e vi ringrazio per avermelo ricordato e insegnato.

Ringrazio Pool, Don Paolo, Don Riccardo per il loro sguardo attento e paterno. Grazie per custodire e aver custodito le mie cadute, per aver creduto in me e per avermi trasmesso la speranza che tutto è possibile: è possibile raggiungere un traguardo, un desiderio e vincere le paure e le ansie ricordandomi sempre di non essere sola.

Ringrazio anche i miei ex colleghi di lavoro in cui per quasi 3 anni ho lavorato come assistente alla poltrona. Grazie per avermi trasmesso l’amore per questo mondo; per avermi insegnato tantissime cose e per la premura che avete sempre avuto nei miei confronti. Un grande grazie anche perché avete lottato con me per raggiungere il mio desiderio, trasmettendomi la grinta e la voglia di non arrendermi.

Ringrazio i miei compagni di viaggio. Il Covid non ci ha permesso di fare le ultime “marachelle” insieme. Sono stata fortunata ad avere compagni come voi. Riuscivate

magicamente ad abbattere l'ansia, prendendola in giro, ridendo e scherzando quando in realtà da ridere c'era ben poco! In particolare grazie a Diona, Chiara e Sara, compagne e amiche di università. Grazie per la premura, la presenza, per avermi ascoltato e sostenuto nei momenti più faticosi. Grazie per avermi tirato su il morale e spesso per aver buttato via le mie ansie e preoccupazioni. Grazie per avermi accolta come compagna e amica.

Ringrazio la prof.ssa Maria Rita Rippono, per la sua grande disponibilità e i suoi preziosi consigli. Ricordo con molto piacere le sue lezioni, lo studio della sua materia e l'esame insieme a lei. Grazie per essere una Brava professoressa: diligente, attenta, precisa ma pur sempre con uno sguardo materno.

Infine un grande grazie va al mio babbo, l'odontotecnico dalle mani d'oro. Grazie babbo per avermi trasmesso inconsciamente l'amore per questa professione. Anche se non sei qui, ti ho sempre portato con me. Prima di ogni esame dicevo "Forza babbo!" e stringevo forte forte il crocifisso che mi hai regalato. So quanto tu saresti e sei fiero di me. Ti porto con me, come ho sempre fatto, in questo giorno così speciale e sono sicura che, anche tu in cielo, festeggi insieme a me!

Grazie vita, grazie Dio e grazie a me stessa per non essermi arresa, ricordandomi che tutto è possibile, a piccoli passi!