



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
Facoltà di Medicina e Chirurgia

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

**Approccio multidisciplinare per l'analisi del
potenziale remineralizzante di tre differenti
agenti fluorati su *white spot lesions***

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

Candidato:
Chiara Castagnari

Correlatore:
Dott. Vincenzo Tosco

Anno Accademico 2021-2022

*A me stessa e a coloro che mi hanno aiutato
a raggiungere questo piccolo grande traguardo*

INDICE

SOMMARIO	1
INTRODUZIONE	2
1 LO SMALTO DENTALE	4
1.1 Amelogenesi	4
1.2 Struttura	6
2 LESIONI INIZIALI DELLO SMALTO	8
2.1 Epidemiologia	9
2.2 Demineralizzazione e remineralizzazione	9
2.3 Eziologia delle lesioni iniziali dello smalto	10
2.3.1 <i>Fattori modificabili</i>	<i>11</i>
2.3.2 <i>Fattori non modificabili</i>	<i>13</i>
2.4 Classificazione	19
2.5 Diagnosi	22
2.6 Prevenzione delle lesioni cariose	26
2.7 Trattamento	27
2.7.1 <i>Agenti remineralizzanti</i>	<i>27</i>
3 ANALISI STRUMENTALI PER LA VALUTAZIONE <i>IN VITRO</i>	35
3.1 Microtomografia Computerizzata (μ-CT)	35
3.2 Microscopio elettronico a scansione	37
3.3 Microdurezza – Vickers	38
3.4 Microspettroscopia Raman	39
4 PROTOCOLLO SPERIMENTALE	42
4.1 Obiettivo dello studio	42
4.2 Materiali e metodi	42
4.2.1 <i>Preparazione del campione</i>	<i>42</i>
4.2.2 <i>Trattamento del campione</i>	<i>44</i>

4.2.3	<i>Analisi strumentali</i>	46
4.2.4	<i>Analisi statistica</i>	48
4.3	Risultati	48
4.4	Discussione	54
4.5	Conclusioni	57
BIBLIOGRAFIA		58
RINGRAZIAMENTI		73

SOMMARIO

Lo scopo di questa tesi di laurea consiste nella valutazione e comparazione del potenziale di remineralizzazione di tre differenti dentifrici, disponibili in commercio, a base di fluoro in diverse formulazioni, sulle lesioni iniziali dello smalto dentale (*white spot lesions, WSLs*). L'analisi è stata condotta attraverso l'utilizzo di tecniche analitiche ad alta risoluzione. La tesi è strutturata in quattro parti. Nella prima parte vengono descritte le caratteristiche generali della struttura dello smalto dentale. La seconda parte è incentrata sulle *white spot lesions*, descrivendone la struttura macroscopica e microscopica, i fattori responsabili della loro formazione, la classificazione, le metodiche diagnostiche, la prevenzione e il loro trattamento, con particolare attenzione agli agenti remineralizzanti. Nella terza parte sono illustrate e descritte le tecniche analitiche ad alta risoluzione che sono state utilizzate per la valutazione delle WSLs *in vitro*. Nella quarta parte, invece, viene descritta la procedura sperimentale e discussi i risultati ottenuti, in modo da trarre conclusioni riguardo le differenze di remineralizzazione e proporre un protocollo utile nella pratica clinica per arrestare, invertire e prevenire la lesione cariosa.

INTRODUZIONE

La carie dentale rappresenta una patologia infettiva a carattere cronico-degenerativo ad eziologia multifattoriale e colpisce circa l'80% della popolazione nei paesi sviluppati (Karlinsky *et al.*, 2010). Deriva dall'interazione nel tempo tra la presenza di un biofilm cariogeno, il consumo frequente di zuccheri, una scarsa igiene orale e i fattori sfavorevoli dell'ospite (Levy *et al.*, 2022). Tali condizioni causano uno squilibrio tra demineralizzazione e remineralizzazione dello smalto dentale con successiva dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite dello smalto (Bergstrand, 2011). Il primo segno clinico della carie dentale è definito *white spot lesion* (WSL), caratterizzato da una demineralizzazione dello smalto senza cavitazione (Weyland, Jost-Brinkmann and Bartzela, 2022; Sadyrin *et al.*, 2020). Tale demineralizzazione causa un'alterazione dell'indice di rifrazione dello smalto, conferendo alla lesione il tipico aspetto gessoso e bianco latte (Alqahtani *et al.*, 2021).

Lo smalto è il tessuto più mineralizzato dell'organismo. Il 96% in peso della sua composizione è rappresentato da sostanza inorganica: idrossiapatite e fosfato tricalcico idrato, mentre il restante 4% è costituito da acqua e da una piccola parte di materiale organico. In presenza di WSL, la componente minerale si riduce e viene sostituita da fluidi organici (Denis *et al.*, 2013). Da un punto di vista eziologico, numerosi sono i fattori che possono causare le WSLs, tra cui difetti di sviluppo dello smalto, fluorosi, traumi, trattamento ortodontico e scarsa igiene orale (Guerra, Mazur, Nardi, *et al.*, 2015).

Nel 1966, Dirks è stato il primo a descrivere la possibile remineralizzazione delle WSLs, come un evento normale nell'ambiente orale (Dirks, 1966). La saliva, infatti, è un fattore biologico importante nella carie dentale, dal momento che svolge numerosi ruoli tra cui la neutralizzazione dell'acido, la fornitura di ioni minerali per favorire la remineralizzazione e la formazione della pellicola acquisita a protezione dello smalto (Karlinsky *et al.*, 2009). Il processo di remineralizzazione e demineralizzazione è regolato dal grado di saturazione dei fluidi orali (saliva e placca) rispetto all'idrossiapatite contenuta nello smalto (Tschoppe *et al.*, 2011). Dato un appropriato cambiamento delle condizioni orali, la remineralizzazione può diventare il processo predominante, portando così alla riparazione della lesione (Featherstone, 2009).

Negli ultimi anni, è emerso un cambiamento terapeutico nella gestione della carie, passando dal tradizionale approccio restaurativo ad un approccio preventivo, sia in età pediatrica che adulta. Pertanto, le WSLs possono essere trattate con diversi protocolli clinici che richiedono l'utilizzo di agenti remineralizzanti e l'applicazione di resine infiltranti (Aref and Alrasheed, 2022).

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare *in vitro* il potenziale di remineralizzazione di tre differenti paste dentifricie disponibili in commercio, contenenti fluoro in diverse formulazioni chimiche, sulle WSLs naturali. Le analisi sono state condotte attraverso l'utilizzo di un approccio multidisciplinare basato su tecniche analitiche ad alta risoluzione quali microspettroscopia Raman, microtomografia computerizzata, microscopio a scansione di elettroni e microdurezza.

1 LO SMALTO DENTALE

Lo smalto dentale è il tessuto più duro e più mineralizzato dell'organismo. Grazie alle sue eccellenti proprietà, costituisce una barriera isolante che riveste la corona dentale e protegge i tessuti sottostanti, in particolare il tessuto vitale del dente, la polpa, da stress termici, fisici e chimici (Lacruz *et al.*, 2017).

1.1 Amelogenesi

Le cellule responsabili della produzione dello smalto, gli ameloblasti, costituiscono un singolo strato cellulare e fanno parte dell'organo dello smalto che è composto dallo strato epiteliale esterno, dal reticolo stellato, dallo strato intermedio e dall'epitelio interno dello smalto (Bartlett, 2013). La deposizione della matrice organica dello smalto incomincia dopo le fasi iniziali della dentinogenesi, cioè subito dopo la prima deposizione di predentina; la deposizione di predentina induce, dopo circa 24-36 ore, le cellule ectodermiche dell'epitelio adamantino interno a differenziarsi, trasformandosi da preameloblasti in ameloblasti polarizzati (Linde and Goldberg, 1993; Rathee and Jain, 2022).

Lo sviluppo dello smalto avviene principalmente attraverso tre fasi, quella secretoria, quella di maturazione, separate da uno stadio di transizione (Yin and Paine, 2017).

Fase di secrezione (Figura 1): gli ameloblasti sintetizzano e secernono le proteine che costituiranno la matrice organica dello smalto, in particolare amelogenina, ameloblastina ed enamulina. Gli ameloblasti secretori hanno una caratteristica unica, ovvero possiedono i processi di Tomes, estensioni triangolari della cellula che si trovano all'estremità distale e che penetrano nella matrice dello smalto. Inoltre iniziano a formarsi i precursori dei cristalli dello smalto, durante questa fase infatti si deposita quasi l'intero volume dello smalto, che è ancora un tessuto molto morbido (Yin and Paine, 2017).

Fase di transizione: breve stadio in cui ci sono cambiamenti morfologici significativi dovuti all'accorciamento degli ameloblasti e alla perdita del processo secretorio di

Tomes. In questa fase ci sono drastici cambiamenti a livello dell'espressione genica e circa il 25% degli ameloblasti muore (Robinson, 2014).

Fase di maturazione (Figura 1): tra le funzioni principali degli ameloblasti ci sono il trasporto ionico, l'equilibrio acido-base, la rimozione/endocitosi dei detriti delle proteine della matrice dello smalto e l'apoptosi. È in questo stadio che i cristalli si espandono in modo considerevole, garantendo durata e durezza allo smalto (Robinson et al., 1995).

Le proteine della matrice dello smalto, il trasporto di ioni e la regolazione del pH sono indispensabili per una corretta mineralizzazione dello smalto (Gil-Bona and Bidlack, 2020).

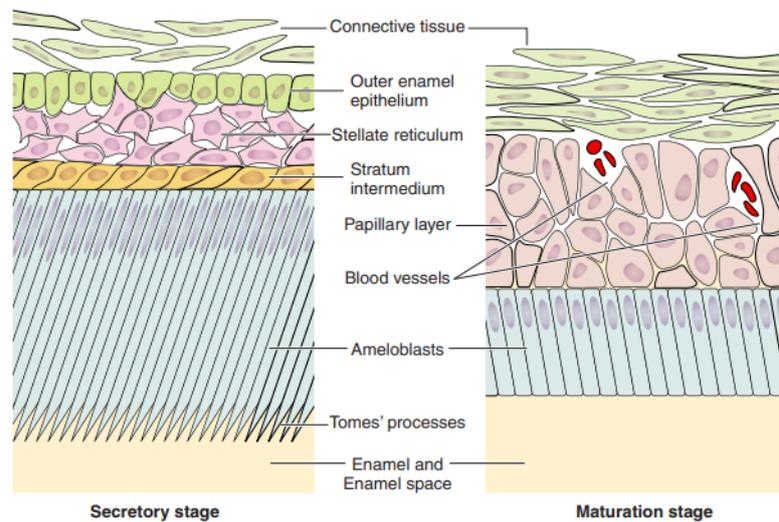


Figura 1 – Stadio di secrezione e di maturazione dell'amelogenesi (Lacruz et al., 2017)

1.2 Struttura

Lo smalto dentale è composto per circa il 95% da componente inorganica, 1% da componente organica e per il 4% da acqua (Beniash et al., 2019).

L'unità base dello smalto è il cristallo di idrossiapatite, rappresentato dalla formula chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Lignon *et al.*, 2015). La sua struttura cristallina mostra una simmetria esagonale che comprende tetraedri PO_4^{3-} e ioni Ca^{2+} (che possiede due tipi di siti) (Figura 2). Gli ioni ossidrilici possono essere sostituiti da altri ioni, che modificano le proprietà dello smalto, come lo ione fluoruro (F^-), carbonato (CO_3^{2-}) o cloruro (Cl^-) (Lacruz *et al.*, 2017).

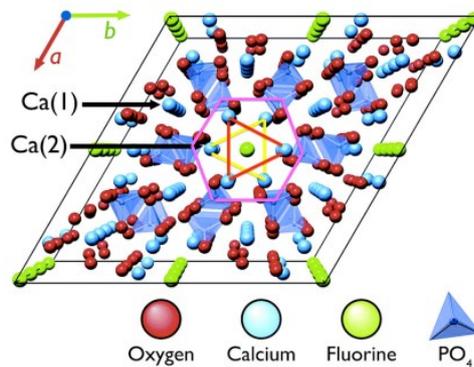


Figura 2 - Struttura cristallina dell'idrossiapatite (Lacruz *et al.*, 2017)

I cristalli di idrossiapatite, paralleli tra loro ma con un decorso ondulato e perfettamente ordinati, costituiscono i prismi dello smalto, che si estendono dalla giunzione amelo-dentinale alla superficie del dente, occupando l'intero spessore dello smalto. I cristalli, larghi 60-70 nm e spessi 25-30 nm, sono disposti parallelamente all'asse longitudinale del prisma nella zona più interna mentre nelle regioni più periferiche formano angoli di ampiezza maggiore. Tra i prismi è presente lo smalto interprismatico che si differenzia per l'orientamento dei cristalli (Arola *et al.*, 2017).

La decussazione dei prismi dello smalto permette l'osservazione delle "bande di Hunter-Schreger", bande chiare alternate a bande scure che possono essere viste quando una sezione longitudinale del dente viene osservata sotto luce riflessa (Figura 3) (Lynch *et al.*, 2011).

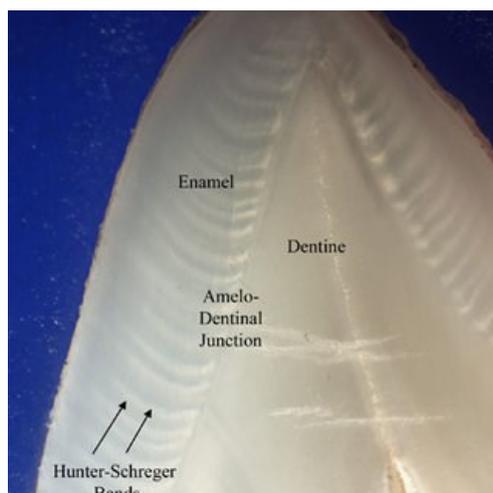


Figura 3 – Sezione longitudinale della cuspidе buccale del primo premolare superiore (Lynch *et al.*, 2010)

L'elevata durezza, resilienza fisica e tenacità sono proprietà che lo smalto possiede grazie al suo elevatissimo contenuto di idrossiapatite e alla relativa disposizione (Wright, 2023).

La porzione organica, costituita dalla matrice extracellulare, rappresenta un sostegno meccanico e fornisce informazioni strutturali durante la fase di mineralizzazione. Costituisce l'1% dello smalto maturo e comprende una serie di proteine molte delle quali uniche dello smalto, che possono essere divise in due grandi gruppi:

- Le amelogenine (perse durante la maturazione) ricche di prolina e istidina, che rappresentano circa il 90%;
- Le enameline (proteine dello smalto maturo) più ricche di serina, glicina e acido aspartico, che rappresentano circa il 10% (Lignon *et al.*, 2015).

Queste proteine agiscono a livello del comportamento viscoelastico e quindi possono interferire nella tenacità e nella resistenza alla frattura dello smalto (Moradian-Oldak, 2012). Nei mammiferi, lo smalto è l'unico tessuto di derivazione epiteliale che si mineralizza in situazioni non patologiche e bisogna porre particolare attenzione agli insulti che lo smalto subisce perché non si rigenera (Lacruz *et al.*, 2017).

Infatti, essendo acellulato lo smalto non può essere sostituito o riparato fisiologicamente, se danneggiato: la capacità di formare nuovo smalto viene persa per sempre una volta che il dente è completamente eretto (Pandya and Diekwisch, 2019; Mitsiadis and Orsini, 2016).

2 LESIONI INIZIALI DELLO SMALTO

Il termine “*white spot lesion*” (WSL) è definito da Fejerskov et al. come “il primo segno di lesione cariosa sullo smalto rilevabile ad occhio nudo” e viene utilizzato accanto ai termini “lesioni iniziali” o “incipienti” (Zabokova-Bilbilova *et al.*, 2014). Le WSLs sono caratterizzate, quindi, da una demineralizzazione sulla superficie dello smalto che appare come una macchia bianca, in cui non è ancora presente una cavitazione (*Figura 4*); pertanto, sono lesioni reversibili (Cosma *et al.*, 2019; Cazzolla *et al.*, 2018).

Il colore bianco latte e l’aspetto opaco, tipici di queste lesioni, sono dovuti alla differenza tra l’indice di rifrazione dello smalto sano e la zona demineralizzata, rendendole nettamente distinguibili dallo smalto circostante. Infatti, la traslucenza dello smalto è una caratteristica correlata alla composizione dello spazio intercristallino e potrebbe essere quantitativamente definita dall’indice di rifrazione dello smalto (ERI). Pertanto, qualsiasi situazione clinica che porti ad un’alterazione dell’organizzazione dei prismi dello smalto, determina una variazione dell’ERI (Puleio *et al.*, 2022).

In particolare, lo smalto sano, idratato dalla saliva, ha un indice di rifrazione pari a 1.62, mentre lo smalto demineralizzato ha un indice di rifrazione compreso tra 1.00 e 1.33 (Saccucci *et al.*, 2022). La lesione diventa clinicamente visibile quando il deficit minerale del corpo della lesione rispetto allo smalto sano raggiunge il 10% (Anil, I. Ibraheem, *et al.*, 2022).



Figura 4 – White spot lesions (Style italiano)

2.1 Epidemiologia

Nella maggior parte dei paesi industrializzati la carie colpisce il 60-90% dei bambini in età scolare e quasi il 100% della popolazione adulta (Gomez, 2015).

Per quanto riguarda le WSLs, i dati degli studi epidemiologici mostrano che la prevalenza dei difetti dello sviluppo dello smalto va dal 10% al 49%, con una spiccata tendenza all'aumento (Guerra, Mazur, Corridore, *et al.*, 2015).

Inoltre, la prevalenza delle WSLs nei denti decidui in età prescolare aumenta nei paesi con un'economia a basso reddito (Campos *et al.*, 2022).

Le WSLs sono molto frequenti nei pazienti con trattamenti ortodontici fissi a causa della ritenzione di placca dovuta alla presenza di attacchi e bande (Puleio *et al.*, 2022).

A causa della pandemia da COVID-19 molti servizi odontoiatrici sono stati sospesi. Con l'implementazione delle restrizioni, gli uffici, le cliniche e gli studi odontoiatrici sono stati chiusi per più mesi e i pazienti non sono stati in grado di accedere alle visite e ai trattamenti necessari. Questo ha portato ad una differenza statisticamente significativa nello sviluppo delle WSLs pre-lockdown rispetto al post-lockdown, la cui prevalenza è aumentata dal 29,5% al 52,8% (Burnheimer *et al.*, 2022).

2.2 Demineralizzazione e remineralizzazione

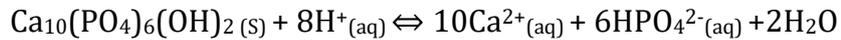
La lesione cariosa iniziale è associata alla perdita dei minerali e alla degradazione proteolitica della struttura dei tessuti duri del dente sotto l'influenza dell'attacco degli acidi prodotti dai batteri. La perdita di fosfati di calcio e carbonati dalla superficie dello smalto può, infatti, portare alla formazione della WSL (Struzycka, 2014).

La saliva ha un ruolo significativo nella remineralizzazione dello smalto dentale. Non solo ha una capacità tampone che permette di neutralizzare il basso pH del cavo orale ma agisce anche come vettore di ioni essenziali, come fluoruro, calcio e fosfato, che hanno un ruolo fondamentale nella remineralizzazione dello smalto (Farooq and Bugshan, 2020).

Nella cavità orale, a seguito dei pasti e delle abitudini di ciascun individuo, si verificano delle variazioni del pH, che causano sulla superficie dei denti fenomeni di demineralizzazione e remineralizzazione. Tali processi fanno parte di un equilibrio

dinamico che regola l'insorgenza, la progressione e la regressione delle lesioni cariose (Huang *et al.*, 2007).

La dissoluzione dell'idrossiapatite aumenta con il diminuire del pH ed è, inoltre, dipendente della concentrazione degli ioni calcio e fosfato in soluzione:



Con la riduzione del pH, la concentrazione di OH^- e PO_4^{3-} si riduce e di conseguenza lo smalto inizia a dissolversi, dando luogo al fenomeno della demineralizzazione. Al contrario, in presenza di un pH maggiore rispetto al valore soglia, associato ad alte concentrazioni di ioni calcio e fosfato, si assisterà al processo inverso, ovvero alla remineralizzazione del tessuto per precipitazione degli ioni. La soglia critica per il pH dello smalto è compresa tra valori di 4,5 e 5,5 (Tschoppe *et al.*, 2011).

La superficie dello smalto dei denti è, quindi, sottoposta costantemente ad un equilibrio, dove a seconda dei fattori che lo influenzano, si può presentare una situazione di sbilanciamento verso la demineralizzazione o al contrario verso la remineralizzazione (Struzycka, 2014).

L'iniziale demineralizzazione dello smalto appare con la dissoluzione del core centrale dei cristalli, con l'allargamento dei micropori e l'arrotondamento dei bordi dei prismi di idrossiapatite. Tale processo nelle fasi iniziali è reversibile, soprattutto con l'utilizzo di agenti remineralizzanti, tuttavia, qualora si intervenga troppo tardi, si instaura una serie di processi che portano alla lesione cariosa (Abou Neel *et al.*, 2016).

2.3 Eziologia delle lesioni iniziali dello smalto

Al giorno d'oggi l'eziologia delle WSLs non è del tutto chiara ed è plausibile che fattori genetici ed ereditari siano coinvolti, insieme a fattori acquisiti, sistemici e ambientali (Guerra, Mazur, Corridore, *et al.*, 2015).

Di seguito vengono riportati i principali fattori modificabili e non modificabili che possono portare alla formazione di WSLs.

2.3.1 Fattori modificabili

Placca batterica

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus* e lattobacilli sono i principali patogeni cariogeni orali per la loro capacità di produrre alti livelli di acido lattico in seguito alla fermentazione di zuccheri. I batteri infatti scompongono i carboidrati fermentabili come glucosio, saccarosio e fruttosio e causano un ambiente acido che porta alla demineralizzazione e alle conseguenti lesioni cariose (Abou Neel *et al.*, 2016). Secondo l'ipotesi della placca ecologica, un minimo livello di placca dentale sopragengivale non è dannoso per il concetto dell'equilibrio microbico, in cui coesistono molte specie microbiche diverse senza causare danni all'ospite. La malattia si verifica quando l'equilibrio è perturbato da cambiamenti nell'ospite, nel microbiota o nell'ambiente (Jakubovics, 2015).

Dieta

Una pratica alimentare inappropriata può prolungare l'esposizione dei denti ai carboidrati fermentabili (Anil and Anand, 2017).

Gli zuccheri possono essere facilmente metabolizzati da molti batteri coinvolti nella formazione del biofilm dentale, generando sottoprodotti acidi che possono portare alla demineralizzazione della struttura del dente. Il carico cariogeno totale è determinato anche dalla forma del prodotto alimentare, cioè, la consistenza fisica degli alimenti contenenti zucchero influisce sul loro tempo di ritenzione in bocca (Meyer *et al.*, 2021). Si possono fare distinzioni tra alimenti che vengono eliminati rapidamente e alimenti adesivi, appiccicosi che variano ampiamente in termini di ritenzione. Tassi di ritenzione particolarmente elevati sono stati riscontrati per prodotti come biscotti dolci, cracker e patatine fritte. Quindi è importante fare attenzione anche a quei prodotti alimentari che contengono zuccheri nascosti e alla loro viscosità (Gupta *et al.*, 2013).

Abitudini e stili di vita

I fattori di rischio comportamentali includono abitudini alimentari, mancanza di igiene orale, esposizione inadeguata al fluoro e controlli odontoiatrici irregolari. Il consumo di zuccheri liberi è un fattore chiave che modula altri fattori, come il biofilm dentale, regolando l'insorgenza della carie (Martignon, Roncalli, *et al.*, 2021).

In particolare nella popolazione adolescenziale, l'uso di bevande sportive ed energetiche è drasticamente aumentato e queste bevande riducono il pH nella cavità orale, consentendo alla placca dentale di prosperare (Michaelis *et al.*, 2022).

Quando il pH salivare scende al di sotto del valore critico di 5,5, gli acidi iniziano a decomporre lo smalto. Quanto più spesso lo smalto è periodicamente esposto a queste condizioni, tanto più inizia a perdere minerali (Damian *et al.*, 2022).

Anche l'acido intrinseco nei casi di reflusso gastroesofageo, anoressia e bulimia può causare usura erosiva dei denti (Shrestha and Rajbhandari, 2018).

Le misure di igiene orale mirano a rimuovere il biofilm dentale, la cui attività metabolica può portare alla perdita di minerali. Pertanto, è plausibile un aumento del rischio di carie nelle persone che non praticano lo spazzolamento dei denti. Perciò gli individui che combinano lo spazzolamento regolare dei denti con dentifrici al fluoro hanno un minor rischio di carie dentale. Il comportamento di sottoporsi regolarmente a controlli periodici, scadenzate in base alla classificazione di rischio del paziente oltre che dall'età, è stato collegato al mantenimento della salute orale (Martignon, Roncalli, *et al.*, 2021).

Trattamento ortodontico

La demineralizzazione o lo sviluppo di white spot lesions (WSLs) nello smalto, in associazione con il trattamento ortodontico con apparecchi fissi, rimane un problema clinico ben noto (*Figura 5*). Le WSLs possono diventare visibili intorno agli apparecchi fissi entro un mese dal posizionamento del bracket, sebbene la formazione di una carie regolare richieda solitamente almeno 6 mesi (Tufekci *et al.*, 2011).

Gli individui con malocclusione di solito hanno difficoltà a eseguire una corretta igiene orale a causa della presenza di siti di ritenzione. Inoltre, gli attacchi adesivi ai denti

rendono più difficile l'igiene orale convenzionale e possono prolungare l'accumulo di placca sulle superfici dei denti. Le WSLs compaiono principalmente sulle superfici buccali dei denti mascellari nel seguente ordine: incisivi laterali, canini, premolari e incisivi centrali. Secondo la letteratura la prevalenza delle WSLs dopo il trattamento ortodontico è di circa il 50% (Lopatiene, Borisovaite and Lapenaite, 2016).

I maschi sono più colpiti rispetto alle femmine e c'è un forte aumento del numero di lesioni soprattutto durante i primi 6 mesi di trattamento. Compaiono come modifica della struttura dello smalto attorno alla base degli attacchi o tra gli attacchi e il margine gengivale nella regione cervicale del dente (Zabokova-Bilbilova *et al.*, 2014).



Figura 5 - WSLs dopo trattamento ortodontico (Heymann and Grauer, 2013)

2.3.2 Fattori non modificabili

Quantità e composizione del flusso salivare

La saliva è il fattore biologico più importante coinvolto nella protezione contro la carie dentale per diversi motivi: la sua capacità tampone ripristina il pH del biofilm dentale quando i batteri producono acidi; il flusso salivare rimuove gli acidi dal cavo orale; è sovrasatura di calcio e fosfato rispetto al minerale dello smalto, favorendo così la remineralizzazione dentale in condizioni favorevoli (Cardoso *et al.*, 2020); le proteine salivari sono i componenti principali della pellicola di smalto acquisita che funge da barriera semipermeabile, riducendo il contatto degli acidi con i denti.

Pertanto, l'iposalivazione e alcuni disturbi sistemici e metabolici, come la sindrome di Sjögren, determinati farmaci e l'irradiazione della testa e del collo, possono causare ipofunzione salivare, aumentando il rischio di carie (Martignon, Roncalli, *et al.*, 2021).

Predisposizione genetica

Le mutazioni in determinati geni provocano la produzione di proteine anomale o riducono la quantità di queste proteine nei denti in via di sviluppo, con conseguente mineralizzazione difettosa che potrebbe influenzare sia l'aderenza batterica che la resistenza dello smalto al pH acido, aumentando così la suscettibilità delle superfici alla carie dentale. Oltre alla mineralizzazione difettosa, le variazioni genotipiche rendono anche lo smalto più suscettibile (Opal *et al.*, 2015). La variazione nei geni di formazione dello smalto influenza le interazioni dinamiche tra la superficie dello smalto e la cavità orale. Quindi diversi geni probabilmente influenzano la suscettibilità individuale alla carie e questi includono geni coinvolti nello sviluppo dello smalto, nella funzione della saliva e nella risposta immunitaria (Vieira, 2013).

Trauma

Gli studi hanno dimostrato che alcune lesioni hanno esiti più favorevoli rispetto ad altre. È stato stimato che il 26-76% delle lesioni provoca la perdita permanente di tessuto duro dentale nei vari tipi di lesioni dentali. Altre complicazioni includono disallineamento e scolorimento dei denti, difficoltà a mangiare, estetica compromessa e disagio (Lam, 2016).

La lesione dentale traumatica nei denti decidui può influenzare il dente stesso e la successiva dentizione a causa della stretta relazione anatomica tra l'apice dei denti decidui e la gemma dei denti permanenti (Abreu *et al.*, 2020).

L'intrusione e l'avulsione dei denti primari sono considerati i tipi di traumi che producono il maggior numero di alterazioni nello sviluppo dei denti permanenti. Le principali conseguenze del trauma dentale primario nello sviluppo dei denti permanenti sono lo scolorimento dello smalto, l'ipoplasia dello smalto, la dilacerazione coronale, la dilacerazione delle radici, le malformazioni odontoma-simili e le alterazioni dell'eruzione (Tsurumachi *et al.*, 2015). Lo scolorimento dello smalto e/o l'ipoplasia sono state le sequele più comuni nei denti permanenti a seguito di un trauma al suo predecessore deciduo. La maggior parte dei difetti di mineralizzazione sono nella metà incisale degli incisivi centrali e laterali (Caeiro-Villasenín *et al.*, 2022).

Fluorosi

Un eccesso di ingestione di fluoro durante la formazione dello smalto può portare a fluorosi dentale e questa condizione è particolarmente osservata nei paesi che hanno alti livelli di fluoruro nella fornitura di acqua (Moynihan and Petersen, 2004).

La fluorosi dentale è un disturbo dello sviluppo dello smalto dentale, causato da esposizioni eccessive ad alte concentrazioni di fluoro durante lo sviluppo dei denti, che porta ad un contenuto minerale inferiore e una maggiore porosità dello smalto (*Figura 6*). La gravità della fluorosi dentale è dose-dipendente e influenzata dal periodo di tempo in cui si verifica la sovraesposizione al fluoro, dalla risposta individuale, dal peso, dai fattori nutrizionali e dalla crescita ossea. Il livello raccomandato per l'assunzione giornaliera di fluoro è 0,05 - 0,07 mg F/Kg/die, che è considerato di grande aiuto nella prevenzione della carie dentale, agendo nella remineralizzazione. Un'assunzione giornaliera al di sopra di questo livello di sicurezza porta ad un aumento del rischio di fluorosi dentale (Alvarez, Celiberti and Ciamponi, 2009).

Si ritiene che l'eccesso di fluoro interferisce con la rimozione delle amelogenine durante la maturazione dello smalto, portando alla formazione di smalto ipomineralizzato. I cambiamenti dello smalto visivamente rilevabili caratteristici della fluorosi dentale sono associati a livelli di fluoruro nell'acqua superiori a 1,5 ppm (Niazi and Pepper, 2022).

Clinicamente, i casi lievi di fluorosi dentale sono caratterizzati da un aspetto bianco opaco dello smalto associato alla comparsa di sottili linee bianche, che, a livelli più elevati di esposizione al fluoro, diventano sempre più definite e più spesse. Negli individui con fluorosi dentale moderata, si osserva una colorazione da gialla a marrone chiaro nelle aree di danno allo smalto. In casi molto gravi, lo smalto si colora di marrone, è molto poroso e contiene relativamente meno minerali e più proteine rispetto allo smalto sano (Lee *et al.*, 2021). Nel 1942, H.T. Dean sviluppò un indice per descrivere e diagnosticare la fluorosi dello smalto. Ha valutato i denti fluorotici in 6 categorie in base alle loro manifestazioni cliniche, compresi i denti normali, a cui è stato assegnato un punteggio di 0. Utilizzando questo indice, Dean ha determinato la concentrazione "ottimale" di fluoro nell'acqua potabile pari a 1 ppm. Questa

classificazione è ancora il "gold standard", sebbene siano stati sviluppati altri indici, come l'indice di fluorosi di Thylstrup e Fejerskov (TFI) ampiamente utilizzato e con una gamma ampliata per le forme più gravi di fluorosi dentale (DenBesten and Li, 2011).



Figura 6 – Fluorosi (Style italiano)

Amelogenesi imperfetta

L'amelogenesi imperfetta (AI) rappresenta un gruppo di condizioni di sviluppo, di origine genomica, che influenzano la struttura e l'aspetto clinico dello smalto di tutti o quasi tutti i denti in modo più o meno uguale e che possono essere associate a cambiamenti morfologici o biochimici in altre parti del corpo (Reddy *et al.*, 2019). La prevalenza varia da 1:700 a 1:14.000, a seconda delle popolazioni studiate. Lo smalto può essere ipoplasico, ipomineralizzato o entrambi e i denti colpiti possono essere scoloriti, sensibili o inclini alla disintegrazione. Molte classificazioni dell'IA si sono evolute dalla divisione originale in tipi ipoplasici e ipocalcificati del 1945. Alcuni sono stati basati esclusivamente sul fenotipo, altri hanno usato il fenotipo come discriminante primario e la modalità di ereditarietà come fattore secondario (Crawford, Aldred and Bloch-Zupan, 2007).

Lo smalto AI è anormalmente sottile, morbido, fragile, ha un'un'alterazione del colore e causa ai pazienti grave imbarazzo, difficoltà alimentari e dolore. È anche associato a risultati sociali negativi e scarsa estetica. L'IA è molto difficile da trattare e c'è una debole base nella programmazione del processo decisionale clinico. Gli interventi si concentrano sull'estetica e sul mantenimento dell'altezza occlusale e della funzione dentale, mantenendo la dentatura naturale il più a lungo possibile (Figura 7) (Smith *et al.*, 2017).



Figura 7 - Amelogenesi imperfetta (Toupenay et al., 2018)

MIH (Molar Incisor Hypomineralization)

L'ipomineralizzazione molare-incisiva (MIH) è un difetto qualitativo dello smalto che colpisce uno o più molari permanenti e può includere anche gli incisivi (*Figura 8*) (Lopes *et al.*, 2021).

Le opacità associate sui denti anteriori hanno meno probabilità di avere problemi funzionali, ma possono causare problemi estetici e psicosociali. La prevalenza riportata di MIH varia ampiamente, dal 3% al 40%, a seconda della popolazione e del paese studiato. Tuttavia, recenti studi suggeriscono che la MIH colpisce circa il 13%-14% dei bambini del mondo (Rodd *et al.*, 2021).

Clinicamente, lo smalto ipomineralizzato si presenta come un'opacità porosa, con un colore che va dal bianco al giallo o marrone, con bordi ben definiti e distinti dallo smalto sano. A volte, l'opacità è così porosa che i denti possono rompersi subito dopo l'eruzione, lasciando la dentina esposta e consentendo lo sviluppo di lesioni cariose. I denti affetti da MIH hanno un alto grado di porosità, che si estende fino alla giunzione amelodentinale. Le opacità gialle e marroni si presentano microscopicamente porose, con un rischio clinico di rottura più elevato rispetto a quello delle opacità bianche (Fragelli *et al.*, 2015).

Lo smalto ipomineralizzato può avere caratteristiche fisiche marcatamente alterate, con deficit di densità minerale fino al 70%, aumento del contenuto proteico (principalmente albumina sierica), diminuzione della durezza e minore resistenza alla frattura, più carbonato e un profilo elementare alterato (Crombie *et al.*, 2013).

Circa un terzo delle lesioni MIH sono gravi, con una gravità crescente associata ad un aumento dello sviluppo di carie, nonché a una rapida rottura tissutale, specialmente in

individui ad alto rischio di carie. I fattori eziologici coinvolti nella MIH sono di natura ambientale e genetica e c'è un'associazione con problemi durante l'ultimo trimestre di gravidanza e malattie infantili (Martignon, Bartlett, *et al.*, 2021).

Viene definita una scala di gravità che classifica la MIH in lieve, moderata e grave. Un'ipomineralizzazione lieve si manifesta con opacità isolate sulla superficie dello smalto, in quella moderata c'è un maggior coinvolgimento dello smalto dentale con presenza di carie su una o due superfici mentre la forma più grave si manifesta con rottura dello smalto, progressione sostanziale della carie e ipersensibilità dentale (Almulhim, 2021).



Figura 8 – MIH (Rodd et al., 2021)

2.4 Classificazione

L'International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) è un sistema che consente il rilevamento e la valutazione della carie dentale, che interessano sia le superfici coronali sia quelle radicolari. L'ICDAS è stato sviluppato per l'uso nella ricerca clinica, nella pratica clinica e per scopi epidemiologici (Dikmen, 2015).

Fino ad oggi la maggior parte degli studi condotti per misurare la prevalenza della carie aveva utilizzato l'indice DMFT/dmft consentendo la registrazione delle sole lesioni cavitate e questo verrà ancora utilizzato ma l'esigenza imminente di un sistema basato sull'evidenza che consentisse il rilevamento e la diagnosi standardizzati della carie in diversi ambienti e situazioni ha portato allo sviluppo del "Sistema Internazionale di rilevamento e valutazione della carie" (ICDAS) (Gugnani and Pandit, 2011). Così, in seguito alla necessità di rilevare anche le lesioni non cavitate, nel 2002 è stato sviluppato l'ICDAS I, successivamente modificato in ICDAS II nel 2005 (Ismail *et al.*, 2007).

L'ICDAS è un sistema di classificazione specifico, accurato e riproducibile, che assegna alle lesioni cariose un codice, che va da 0 a 6, dove un valore più alto è correlato a una lesione più estesa (Ghodasra and Brizuela, 2022).

Il requisito principale per l'applicazione del sistema ICDAS è l'esame di denti puliti e asciutti. L'asciugatura (tempo suggerito 5 secondi) è la chiave per la rilevazione di lesioni non cavitate, inoltre devono essere rimossi eventuali residui di placca e detriti e i denti devono essere puliti con uno spazzolino da denti o una coppetta per profilassi prima dell'esame clinico. In caso di dubbio o per confermare la valutazione visiva può essere necessario l'utilizzo della sonda (OMS/CPI/PSR) (Shivakumar, Prasad and Chandu, 2009).

Codice 0		<i>Superficie sana del dente:</i> dopo un'asciugatura prolungata all'aria non dovrebbe esserci evidenza di carie (alterazione assente o discutibile della traslucenza dello smalto).
Codice 1		<i>Primo cambiamento visivo nello smalto:</i> dopo una prolungata asciugatura all'aria è visibile un'opacità cariosa o uno scolorimento non coerente con l'aspetto clinico dello smalto sano.
Codice 2		<i>Distinto cambiamento visivo nello smalto:</i> il dente, sia quando è asciutto che umido, presenta un'opacità cariosa o uno scolorimento non coerente con l'aspetto clinico dello smalto sano.
Codice 3		<i>Disgregazione localizzata dello smalto a causa di carie senza dentina visibile o ombre sottostanti:</i> il dente bagnato presenta lo stesso aspetto descritto nel codice 2 mentre il dente asciutto mostra una perdita, dovuta a carie, della struttura del dente all'ingresso o all'interno della fossa. La dentina non è visibile nelle pareti o nella base della cavità/discontinuità.
Codice 4		<i>Ombra scura sottostante alla dentina con o senza disgregazione localizzata dello smalto:</i> ombra (grigia, blu o marrone) di dentina scolorita visibile attraverso una superficie di smalto apparentemente intatto che può mostrare o meno segni di disgregazione localizzata. L'aspetto dell'ombra si vede più facilmente quando il dente è bagnato.
Codice 5		<i>Cavità distinta con dentina visibile:</i> cavitazione in smalto opaco o scolorito che espone la dentina sottostante. Il dente bagnato può avere la dentina più scura, visibile attraverso lo smalto. Quando è asciutto è evidente la perdita della struttura del dente all'ingresso o all'interno della fossa e la dentina è esposta.
Codice 6		<i>Cavità estesa e distinta con dentina visibile:</i> perdita evidente della struttura del dente, la cavità è sia profonda che ampia e la dentina è chiaramente visibile sulle pareti e alla base. Una carie estesa coinvolge almeno metà della superficie del dente e può raggiungere la polpa.

Tabella 1 - International Caries Detection and Assessment System
(Ismail et al., 2007; Dikmen, 2015)

Sulla base dell'ICDAS, l'International Caries Detection and Evaluation System Collaboration Committee ha proposto l'*International Caries Classification and Management System* (ICCMS), un insieme completo di protocolli clinici che permettono di affrontare tutte le decisioni diagnostiche, preventive e riparative necessarie con l'obiettivo di preservare la struttura naturale del dente e ripristinarla solo quando indicato (Ismail *et al.*, 2015).

L'ICCMS sintetizza la valutazione radiografica e clinica per classificare le lesioni, con i codici ICDAS uniti, in superfici sane (codice 0), carie allo stadio iniziale (codici 1 e 2), carie allo stadio moderato (codici 3 e 4) e carie in stadio esteso (codici 5 e 6), prendendo in considerazione anche l'attività della lesione (*Figura 9*) (Cheng *et al.*, 2022).

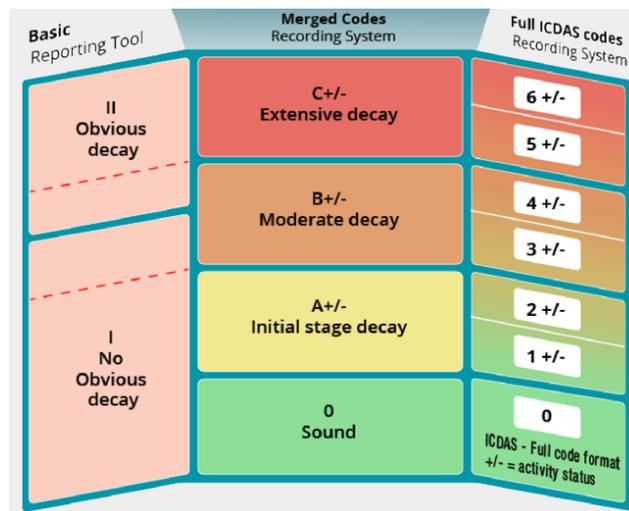


Figura 9 - ICDAS's *International Caries Classification and Management System* (ICCMS)
(Pitts, Ekstrand, and The ICDAS Foundation, 2013)

2.5 Diagnosi

Un fattore importante che contribuisce all'elevata prevalenza è che la carie può progredire inosservata nelle fasi iniziali e successivamente svilupparsi con una cavità. Pertanto, la ricerca sul campo dovrebbe essere focalizzata sulla diagnosi precoce e accurata della carie incipiente, così da ridurre la prevalenza della carie e attuare protocolli clinici minimamente invasivi (Gomez, 2015).

La diagnosi delle WSLs può essere eseguita attraverso l'esame visivo, considerando la forma, le dimensioni, il colore e la posizione di questi difetti. Anche la profondità della lesione è un fattore importante da analizzare per definire il trattamento. Per questo ci si può avvalere di altri strumenti che possono aiutare nella diagnosi (Farias *et al.*, 2022).

La diagnosi visiva combinata con la radiografia bitewing è il metodo più comune di diagnosi della carie e l'uso di metodi aggiuntivi dovrebbe essere esplorato ulteriormente. ICDAS, che ha dimostrato di essere un metodo accurato e riproducibile, identifica le lesioni cariose sulla base del loro *aspetto clinico visivo*. Anche la valutazione dell'attività della lesione è molto importante perché aiuterà nelle decisioni terapeutiche, in particolare quando dovrebbero essere attuate opzioni preventive (Al Dhubayb *et al.*, 2021). Le *radiografie* sono l'ausilio di rilevamento più utilizzato, in particolare la tecnica del bitewing. È stato dimostrato in letteratura che l'uso delle radiografie è più sensibile dell'ispezione clinica per rilevare lesioni prossimali e per lesioni occlusali nella dentina, per stimare la profondità della lesione e per monitorare il comportamento della lesione (Wenzel, 2004).

Il metodo di rilevamento della carie più comune è quindi la combinazione dell'esame visivo-tattile integrato da radiografia bitewing, però, metodi tradizionali combinati con metodi più sensibili possono migliorare la diagnosi della carie dentale, infatti è stata sviluppata una serie di nuovi sistemi di rilevamento, come: L'Electronic Caries Monitor (ECM), il Quantitative light-induced fluorescence (QLF), FOTI e DIAGNOdent (Gomez, 2015).

L'*Electronic Caries Monitor (ECM)* impiega una singola corrente alternata a frequenza fissa che tenta di misurare la "resistenza di massa" del tessuto dentale. Questo può essere intrapreso a livello di sito o di superficie (Pretty and Ellwood, 2013).

La *fluorescenza quantitativa indotta dalla luce (QLF)* (Figura 10) è un sistema a luce visibile che offre l'opportunità di rilevare la carie precoce e quindi monitorare longitudinalmente la loro progressione o regressione. Utilizzando due forme di rilevamento fluorescente (verde e rosso) può anche essere in grado di determinare se una lesione è attiva o meno e prevedere la probabile progressione di una determinata lesione (Pretty, 2006). Quando è presente una lesione, un aumento della diffusione della luce fa apparire la lesione come macchie scure su uno sfondo verde brillante. Qualsiasi area con una diminuzione della fluorescenza superiore al 5% è considerata una lesione (Gomez, 2015). Questo metodo ha dimostrato di essere sensibile per l'individuazione di lesioni incipienti precoci, anche se è soggetto a effetti confondenti come la saliva, il tempo di asciugatura, l'angolazione e le macchie (Ferreira Zandoná *et al.*, 2010).



Figura 10 - *Quantitative light-induced fluorescence (QLF)* (Gomez, 2015)

Nel 1998 è stata presentata al mercato la fluorescenza laser (DIAGNOdent), utilizzata come strumento complementare all'esame visivo per la diagnosi della carie occlusale. Il rilevamento si basa sul principio che, quando il laser a diodi con lunghezza d'onda di 655 nm viene irradiato sulla superficie dentale, viene assorbito dai metaboliti dei batteri intraorali e questi metaboliti emettono una fluorescenza rossa. Questa fluorescenza riflessa dalla superficie dentale è indicata con un numero compreso tra 0 e 99 sullo schermo del dispositivo. Maggiore è il numero, maggiore sarà l'area interessata dalla lesione. Pertanto la fluorescenza laser fornisce un metodo quantitativo e non invasivo per il rilevamento della carie dentale (Nokhbatolfoghahaie *et al.*, 2013).

La transilluminazione a fibre ottiche (FOTI) offre un metodo alternativo di diagnosi che può essere utilizzato per integrare l'esame clinico. È una procedura semplice, non invasiva e indolore che può essere utilizzata ripetutamente senza rischi per il paziente (Strassler and Pitel, 2014). La FOTI è un metodo ampiamente accettato per il rilevamento della carie ed è ampiamente utilizzato per rilevare la carie prossimale per le quali è particolarmente adatto (Gomez *et al.*, 2013). Uno stretto fascio di luce bianca brillante è diretto attraverso le aree di contatto tra superfici interprossimali e la rottura della struttura cristallina, che si verifica nella demineralizzazione, devia il fascio di luce e produce ombre. La procedura è stata validata istologicamente e ha livelli di sensibilità e specificità che superano quelli delle radiografie (Davies *et al.*, 2001). Una lesione cariatata sembra un'ombra all'interno della struttura dentale perché ha un indice di trasmissione della luce inferiore rispetto al tessuto normale. Il calcolo appare come un'area più scura sulla superficie del dente (*Figura 11*) (Ghodasra and Brizuela, 2022).

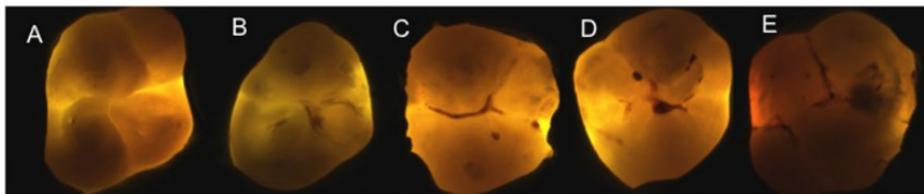


Figura 11 - FOTI; A: No shadows; B: Thin-grey shadow into enamel; C: Wide-grey shadow into enamel; D: Microrcavitated lesion shadow <2 mm in dentine; E: Shadow >2 mm in dentine.
(Gomez, 2015)

Valutazione del rischio di carie

La valutazione del rischio di carie (CRA) ha un impatto sulla valutazione della difficoltà della prevenzione della carie e sulla pianificazione del trattamento prima del trattamento della carie dentale; la rivalutazione del rischio dopo il trattamento è correlata all'effetto curativo e alla prognosi, che è anche significativamente importante nella gestione della carie (Wei *et al.*, 2022). Ci sono diversi sistemi di valutazione del rischio di carie dentale in tutto il mondo, tra cui la valutazione del rischio di carie dell'American Dental Association (ADA), lo strumento di valutazione del rischio di

carie (CAT), la gestione della carie mediante valutazione del rischio (CAMBRA) e il Cariogram.

Valutazione del rischio di carie dell'American Dental Association (ADA): sistema di proposto dall'ADA nel 2004 e suddiviso in due moduli. Un modulo è per pazienti di età compresa tra 0 e 6 anni e l'altro è per pazienti di età superiore a 6 anni. Comprende principalmente tre aspetti: condizioni contribuenti, condizioni generali di salute e condizioni cliniche. Il sistema suddivide il rischio di carie in gradi alto, moderato e basso ed è più comunemente utilizzato per i bambini (Featherstone *et al.*, 2021).

Strumento di valutazione del rischio di carie (CAT): sviluppato dall'American Academy of Pediatric Dentistry, è suddiviso in 2 moduli: (1) per bambini di età compresa tra 0 e 5 anni; (2) per bambini ≥ 6 anni, adolescenti e adulti. Gli indicatori di valutazione del CAT riguardano i fattori di rischio (sociali/ biologici), i fattori protettivi e i riscontri clinici. È utilizzato principalmente nei neonati, nei bambini e negli adolescenti (Cheng *et al.*, 2022).

Gestione della carie mediante valutazione del rischio (CAMBRA): proposto per la prima volta dalla California Dental Association nel 2002, è stato successivamente modificato per formare il formato esistente. Si compone di due tabelle: 0-6 anni e oltre 6 anni. I suoi criteri di valutazione includono indicatori patologici, fattori di rischio, fattori protettivi e fattori bioprotettivi (Coelho *et al.*, 2022).

Cariogram: sistema di valutazione del rischio di carie programmato al computer, sviluppato da studiosi svedesi e composto da 9 fattori di rischio di carie. Il sistema può eseguire analisi ponderate sui dati di input e applicare un grafico a torta per prevedere il rischio di carie complessivo del paziente; nel frattempo, può dimostrare le rispettive influenze di diversi fattori di rischio, prevedere la possibilità individuale di sviluppare carie in futuro e proporre metodi mirati per prevenire nuove carie (Cheng *et al.*, 2022).

2.6 Prevenzione delle lesioni cariose

La carie è una malattia multifattoriale con un'elevata prevalenza nella popolazione mondiale. La sua progressione può essere prevenuta nelle fasi iniziali della demineralizzazione attraverso l'utilizzo di agenti remineralizzanti.

Negli ultimi anni, nel campo della ricerca odontoiatrica è stata prestata un'attenzione significativamente crescente al trattamento delle lesioni cariose non cavitate con metodi di remineralizzazione non invasivi per ottenere il ripristino della struttura dello smalto (Dixit *et al.*, 2021).

La strategia più importante è quella di prevenire la demineralizzazione e la formazione di biofilm. La prevenzione dovrebbe iniziare educando e motivando il paziente ad una dieta a basso contenuto di zuccheri e alla corretta igiene orale. Il controllo meccanico della placca e la rimozione mediante un corretto spazzolamento delle superfici dentali, almeno due volte al giorno, con dentifricio contenente fluoro, specialmente nelle aree di ritenzione del biofilm, è fortemente raccomandato (Mathur and Dhillon, 2018).

In associazione all'igiene orale domiciliare, l'igiene orale professionale riduce la carica batterica, aumenta l'efficacia dello spazzolamento e facilita la pulizia da parte del paziente aiutando il mantenimento di una bocca sana e la diminuzione del rischio di carie dentale. Durante le visite di richiamo, la motivazione del paziente deve essere rivalutata, ripetendo le istruzioni per una corretta igiene orale domiciliare e le abitudini alimentari da rispettare (Khoroushi and Kachuie, 2017).

L'applicazione locale di composti a base di fluoro sulla superficie del dente è un fattore chiave nella riduzione della prevalenza e sviluppo della patologia cariosa osservato in quasi tutte le fasce d'età (Kirsch *et al.*, 2019). La somministrazione topica di fluoro sotto forma di vernice, gel, collutorio o dentifricio è stata ampiamente utilizzata come intervento preventivo per la carie per oltre tre decenni (Valeria CC Marinho *et al.*, 2003).

L'uso di dentifrici con un contenuto di fluoro di 1000 ppm o 1450 ppm per un periodo di circa 3 anni ha comportato una riduzione media del numero di denti affetti da carie (valori DMFT di 0,26 o 0,37 denti, rispettivamente calcolati). Inoltre, le vernici al fluoro applicate professionalmente nella dentizione permanente hanno provocato un tasso medio di riduzione della carie del 43%. L'applicazione della vernice al fluoro,

sviluppata per aderire alla superficie dello smalto per lunghi periodi (fino a 12 ore o più) e rilasciare lentamente il fluoro sulle superfici dello smalto, è consigliata a intervalli di tempo dipendenti dal rischio da due a quattro volte all'anno. Ulteriori misure come gel e collutori al fluoro sono disponibili a partire dai 6 anni e, sulla base del DMFT, hanno provocato rispettivamente tassi di riduzione della carie del 32% e 23% (Zabokova-Bilbilova *et al.*, 2014).

È importante porre l'attenzione all'anatomia delle superfici occlusali dei settori posteriori che presentano solchi e fessure, zone con accesso salivare minimo più inclini al ristagno di placca e batteri cariogeni (Sridhar, 2016). Per tale motivo, la sigillatura dei solchi è stata introdotta a scopo preventivo nel 1960, con l'intenzione di inibire i batteri che si accumulano nei solchi. È infatti un ottimo strumento per la prevenzione delle carie nelle superfici occlusali (Sæthre-Sundli *et al.*, 2022).

2.7 Trattamento

Il processo di remineralizzazione dei tessuti dentali è stato studiato nel corso di molti decenni e ha portato allo sviluppo di tecnologie in grado di promuovere la remineralizzazione dello smalto o ridurre la demineralizzazione, offrendo così potenziali benefici per la salute orale (Indrapriyadharshini *et al.*, 2018). Di seguito sono analizzati i principali trattamenti e protocolli clinici non invasivi utilizzati, ponendo particolare attenzione all'utilizzo di agenti remineralizzanti.

2.7.1 Agenti remineralizzanti

2.7.1.1 Fluorati

Il fluoro è stato introdotto in odontoiatria oltre 70 anni fa ed è ora riconosciuto come il principale fattore responsabile del declino della prevalenza della carie che è stato osservato in tutto il mondo (Buzalaf *et al.*, 2011).

Il fluoro riesce ad inibire la demineralizzazione e a promuovere la remineralizzazione attraverso diversi meccanismi, che interessano i tessuti duri del dente e il biofilm.

Per quanto concerne i tessuti duri, si ha la formazione di uno strato di copertura di fluoruro di calcio sulla superficie del dente, che rappresenta un deposito di fluoro che viene rilasciato a basse concentrazioni. Il fluoro influisce sull'equilibrio dinamico demineralizzazione-reminerizzazione, promuovendo la reminerizzazione e viene assorbito nel reticolo cristallino in caso di demineralizzazione, formando un minerale scarsamente solubile in acido, la fluorapatite (*Figura 12*) (Wegehaupt and Menghini, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

Riguardo il biofilm, inibisce la glicolisi batterica, riducendo la formazione di acido dalla degradazione batterica dei carboidrati, ritarda la formazione della placca occupando i siti di adesione dei batteri e promuove la simbiosi batterica inibendo la formazione di un biofilm disbiotico e cariogeno (Schiffner, 2021).

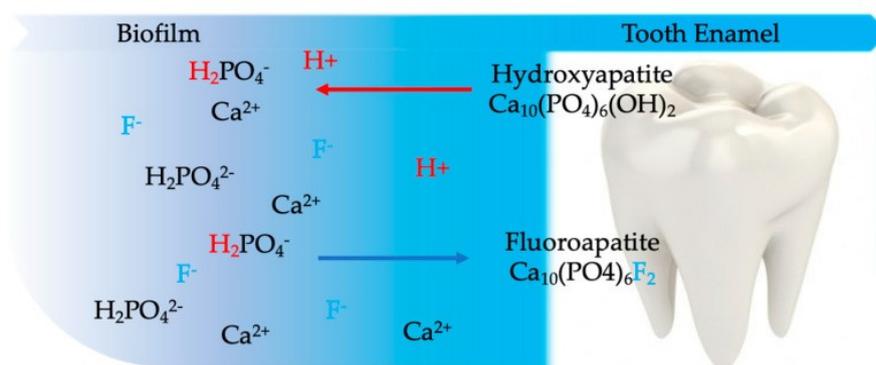


Figura 12 – Formazione di Fluoroapatite (Fiorillo *et al.*, 2020)

Per la sua reattività il fluoro non si trova libero in natura ma sottoforma di diversi composti (Johnston and Strobel, 2020).

2.7.1.1.1 Fluoruro di sodio

Il fluoruro di sodio (NaF) è il composto di fluoruro più semplice e si trova in numerosi dentifrici. Ha un effetto batteriostatico per cui gli ioni F⁻ liberi dal NaF dissociato passano attraverso le membrane cellulari dei batteri e interferiscono con il metabolismo batterico (Rajendiran *et al.*, 2021).

L'effetto a breve termine è una caratteristica del fluoruro di sodio e la significativa diminuzione della vitalità batterica osservata su diverse superfici orali è associata all'aumento immediato della biodisponibilità del fluoruro (Naumova *et al.*, 2019).

2.7.1.1.2 Fluoruro amminico

Il fluoruro amminico (AmF) è un composto costituito da due gruppi funzionali: l'ammina organica cationica, agente tensioattivo con proprietà antiglicolitiche, e lo ione fluoruro (Shani, 1996). L'attività antibatterica deriva principalmente dalla natura cationica dell'ammina organica, infatti, la riduzione della carica batterica è principalmente attribuibile alle cariche elettrostatiche del fluoruro amminico, carico positivamente, rispetto alle superfici cellulari batteriche che sono anioniche (Kirsch *et al.*, 2019). I vantaggi dell'AmF sono molteplici: le molecole amminiche (organiche) si legano facilmente alla superficie dello smalto, la sua proprietà tensioattiva superficiale porta a una rapida distribuzione del fluoro e al rivestimento omogeneo sulla superficie del dente per un periodo prolungato. Si ha quindi una maggiore biodisponibilità del fluoro che ha un ruolo chiave nella protezione dello smalto dalla decalcificazione acida (Sh *et al.*, 2013; Madléna, 2013).

2.7.1.1.3 Monofluorofosfato di sodio

Il monofluorofosfato di sodio (MFP) è stato segnalato, nel 1950, per la sua attività anticarie e per essere di bassa tossicità. Queste caratteristiche, oltre alla solubilità relativamente elevata del sale, hanno portato all'adozione mondiale dell'MFP come agente nelle paste dentifricie (White, 1983).

L'MFP ha un'efficacia, nella prevenzione della carie, statisticamente equivalente al fluoruro di sodio (NaF) ma ha un vantaggio nelle applicazioni cliniche a causa della bassissima biotossicità del fluoro nello stato ionico complesso. Nella saliva e nelle sostanze chimiche in cui gli ioni di calcio sono sovrasaturi, l'MFP può mantenere un'elevata concentrazione di ioni fluoruro. Quando l'MFP reagisce con il tessuto dentale, il suo effetto immediato dopo l'applicazione è inferiore a quello del NaF, e anche la resistenza agli acidi vicino allo strato superficiale è inferiore (Tanizawa *et al.*, 1991). Tuttavia, a causa della differenza del suo meccanismo d'azione rispetto a quello

del NaF, l'MFP penetra anche in profondità e può anche formare uno strato resistente agli acidi più spesso e uniforme rispetto al NaF. Quindi, sebbene l'MFP sia meno resistente agli acidi sullo strato superficiale rispetto a NaF, riesce a penetrare in profondità nella struttura del dente e ad essere resistente agli acidi (Satou, Yamagishi, *et al.*, 2022).

2.7.1.1.4 Fluoruro stannoso

Il controllo della crescita del biofilm è un primo passo importante verso il mantenimento dell'eubiosi e di una bocca sana. Il fluoruro stannoso (SnF_2) cambia l'architettura del biofilm batterico e l'espressione genica, rendendo il biofilm meno adesivo e non virulento (Gumber *et al.*, 2022).

Queste proprietà antibatteriche sono il risultato dell'inibizione degli enzimi batterici responsabili del trasporto del glucosio e del metabolismo batterico, inclusa l'inibizione delle metalloproteinasi della matrice (MMP) ad opera degli ioni stannosi (Sn^{2+}) (Kirsch *et al.*, 2019; Cvikl *et al.*, 2018).

Ci sono due meccanismi ben documentati della proprietà anti-carie aumentata di SnF_2 . Uno è dovuto alla capacità del fluoruro stannoso di facilitare l'assorbimento del fluoro e, di conseguenza, migliorare la remineralizzazione dello smalto e arrestare la demineralizzazione (Algarni *et al.*, 2015); l'altro è invece la capacità del SnF_2 di inibire l'acidogenicità della placca dentale disturbando il sistema di trasporto della membrana batterica e inibendo i sistemi enzimatici essenziali nella fermentazione degli zuccheri (Cheng *et al.*, 2017).

2.7.1.1.5 Fluorofosfato acidulato

Il fluorofosfato acidulato (APF) è disponibile in diversi formati ma si preferisce il gel a causa della stabilità del pH e della ridotta probabilità di deglutizione (Blinkhorn and Mekertichian, 2013; Darvell, 2018). L'uso di un acido contenente fosfati altera l'equilibrio favorendo la formazione di idrossiapatite/fluorapatite, rafforzando così la struttura dello smalto. L'APF è efficace anche perché l'acidificazione ne facilita l'assorbimento; d'altra parte, si deve porre attenzione all'acidità dell'APF perché potrebbe corrodere alcuni materiali da restauro (Brown and Dodds, 1998).

2.7.1.1.6 F-ACP

L'associazione tra fluoro e ACP permette di ottenere un composto con proprietà anticarie e remineralizzanti potenziate. L'aggiunta del fluoruro non ha variato le caratteristiche fisico-chimiche dell'ACP ma ha portato a una conversione più rapida dell'ACP in fase cristallina quando immerso in soluzione acquosa (Iafisco *et al.*, 2018). Queste caratteristiche suggeriscono che F-ACP può essere utilizzato come materiale in grado di arrestare il processo carioso e inibire i batteri cariogeni, ripristinando lo smalto demineralizzato (Degli Esposti *et al.*, 2022).

2.7.1.1.7 CPP-ACFP

Il vantaggio della caseina fosfopeptide - fosfato di calcio amorfo associata a fluoro (CPP-ACFP) è la disponibilità di calcio, fosfato e fluoro in un prodotto. Ciascuna molecola di CPP può legare fino a 25 ioni calcio, 15 ioni fosfato e 5 ioni fluoruro. La CPP-ACP, combinata con il fluoro, ha un'azione aggiuntiva nell'inibizione della demineralizzazione e nella remineralizzazione delle lesioni iniziali dello smalto. (Reema, Lahiri and Roy, 2014; Nadar *et al.*, 2022).

2.7.1.1.8 Bioapatite associata a fluoro

La combinazione di bioapatite e fluoro causa la formazione di uno spesso strato di rivestimento sulla superficie dello smalto, permettendo una migliore interruzione della demineralizzazione rispetto al metodo convenzionale, sia qualitativamente che quantitativamente (Satou, Iwasaki, *et al.*, 2022). Il rivestimento formato garantisce quindi una maggiore resistenza agli acidi perché ne impedisce la penetrazione. Contribuiscono a questo meccanismo anche la piccola dimensione delle particelle di bioapatite e la sua eccellente reattività con il fluoruro (Iwasaki, Satou and Sugihara, 2022).

2.7.1.1.9 Fluoruro di diammina d'argento

Il fluoruro di diammina d'argento (SDF) è un fluoruro topico che contiene il 5% (peso/volume [p/v]) di fluoruro e dal 24% al 27% (p/v) di argento. È un liquido trasparente che combina gli effetti antibatterici dell'argento e gli effetti remineralizzanti del fluoruro ed è quindi un promettente agente terapeutico per la gestione delle lesioni cariose (Tinanoff, 2019). È efficace nella riduzione di specifici batteri cariogeni e ha un'importante azione remineralizzante su smalto e dentina (Crystal and Niederman, 2019).

2.7.1.2 Non fluorati

Il fluoro è il "gold standard" nella prevenzione della carie e nell'arresto del loro sviluppo, la tradizionale remineralizzazione a base di fluoro rimane la pietra angolare per la gestione della carie con il più alto livello di revisioni sistematiche a supporto ma ulteriori agenti remineralizzanti sono spesso necessari in individui ad alto rischio di carie (Philip, 2019).

2.7.1.2.1 Fosfato di calcio amorfo

Il fosfato di calcio amorfo (ACP) è un composto reattivo e solubile che rilascia ioni di calcio e fosfato per convertirsi in idrossiapatite e remineralizzare lo smalto quando entra in contatto con la saliva. Formandosi sullo smalto dei denti e all'interno dei tubuli dentinali, l'ACP fornisce un serbatoio di ioni calcio e fosfato nella saliva (Ferreira Zandoná, Ritter and Eidson, 2019). L'applicazione dell'ACP per la remineralizzazione dei denti si basa su due principi: (i) rilascio graduale di ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} che genera una sovrasaturazione locale e innesca la remineralizzazione dei tessuti duri e (ii) adesione alla superficie dei tessuti duri, essendo trasformato in HA (Iafisco *et al.*, 2018). L'ACP è ampiamente applicato in campo biomedico grazie alla sua eccellente bioattività, elevata adesione cellulare, tasso di biodegradazione regolabile e buona osteoconduzione (Zhao *et al.*, 2011).

Tuttavia, l'ACP ha scarsa stabilità e tende a trasformarsi facilmente in idrossiapatite in una soluzione acquosa con conseguente perdita della capacità di remineralizzazione però ci sono varie proteine e ioni che possono stabilizzare l'ACP (Yan *et al.*, 2022).

2.7.1.2.2 Fosfopeptide di caseina - fosfato di calcio amorfo

La fosfopeptide di caseina - fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP) è una sostanza bioattiva a base di caseina, un derivato proteico del latte. Può fungere da serbatoio di ioni calcio e fosfato biodisponibili ed è facilmente solubile nella saliva, creando un gradiente di diffusione che gli consente di localizzarsi nella placca sopragengivale. Le condizioni di basso pH che si verificano durante un attacco cariogeno facilitano il rilascio di ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} , inibendo la demineralizzazione e favorendo la remineralizzazione della lesione incipiente per precipitazione degli ioni rilasciati (Zabokova-Bilbilova *et al.*, 2014). È stato dimostrato che riduce la demineralizzazione dello smalto e promuovono la remineralizzazione tamponando le attività degli ioni calcio e fosfato liberi, incorporando l'ACP nella placca e sulle superfici dei denti e mantenendo così uno stato di sovrasaturazione rispetto allo smalto dei denti (Li *et al.*, 2014). Il modello di remineralizzazione prodotto da CPP-ACP ha dimostrato di migliorare significativamente l'estetica, la forza e la resistenza agli acidi della WSL remineralizzata (Philip, 2019). Infatti, CPP-ACP è in grado di riempire i pori dello smalto sotto la superficie, diminuendo la differenza di indice di rifrazione tra smalto poroso demineralizzato e smalto sano, migliorando così la traslucenza della lesione del punto bianco (Aref and Alrasheed, 2022).

2.7.1.2.3 Nano-idrossiapatite di sintesi

La nano-idrossiapatite (nHAP) ha una composizione chimica e strutturale molto simile ai cristalli di idrossiapatite dello smalto umano, inoltre è più biocompatibile, ha una maggiore bioattività, riassorbimento e qualità meccaniche rispetto all'HA (Wierichs *et al.*, 2022). L'effetto biomimetico della nano-idrossiapatite si basa sulla sua interazione con i tessuti biologici e sulla sua capacità di imitare i materiali biogeni nelle loro funzionalità (Scribante *et al.*, 2020).

L'nHAP ha molti effetti benefici, tra cui una maggiore remineralizzazione nelle lesioni iniziali dello smalto, inibizione della carie, diminuzione della demineralizzazione, aumento della luminosità dei denti, diminuzione dell'ipersensibilità dentinale e del dolore associato (Anil, Ibraheem, *et al.*, 2022). Inoltre, l'uso di nanoidrossiapatite dopo

il trattamento ortodontico contribuisce a ridurre la ruvidità e la sensibilità post-debonding. Questo avviene perché gli strati di nHAP depositati sulla superficie dello smalto sono estremamente resistenti alle soluzioni acide e quindi possono proteggere lo smalto sottostante dalla futura demineralizzazione (Verma and Muthuswamy Pandian, 2021).

2.7.1.2.4 Peptidi autoassemblanti

I recenti sviluppi nella ricerca hanno rivelato il ruolo di trattamento con peptidi che hanno dimostrato un effetto combinato di aumento del guadagno di minerali e inibizione della perdita di minerali dal dente. I monomeri di P₁₁₋₄, in determinate condizioni ambientali, si autoassemblano formando impalcature tridimensionali biocompatibili paragonabili alla matrice dello smalto e i gruppi anionici delle catene laterali P₁₁₋₄ attraggono ioni Ca²⁺, inducendo la precipitazione di HA in situ, con conseguente aumento della densità minerale. Il fosfato di calcio nella saliva aiuta nella deposizione di cristalli attorno a questa matrice (Arifa, Ephraim and Rajamani, 2019). Il peptide autoassemblante P₁₁₋₄ costruisce una matrice tridimensionale sotto la lesione cariosa iniziale, replicando la capacità delle proteine della matrice dello smalto di modellare e nucleare l'idrossiapatite e quindi fungere da impalcatura per la rigenerazione (B K, R and Puranik, 2022, pp. 11–4). La remineralizzazione biomimetica in combinazione con l'applicazione di fluoro, che migliora il risultato, è un trattamento efficace e non invasivo per le lesioni iniziali dello smalto, nonostante alcuni studi abbiano dimostrato che questo trattamento provoca minor remineralizzazione e miglioramento estetico delle lesioni rispetto ad altri interventi (Dawasaz *et al.*, 2022).

3 ANALISI STRUMENTALI PER LA VALUTAZIONE *IN VITRO*

3.1 Microtomografia Computerizzata (μ -CT)

I progressi raggiunti nella tecnologia del tubo a raggi X, nella realizzazione di rilevatori e nella potenza computazionale dell'hardware moderno, hanno permesso una vasta applicazione della Tomografia Computerizzata a raggi X (μ -CT) nella ricerca biomedica, per studi morfologici e funzionali di elementi dentari, biomateriali e vari tessuti umani (Giuliani and Cedola, 2018). Il sistema di tomografia a raggi X consente, in maniera non distruttiva, di visualizzare e misurare strutture interne di oggetti tridimensionali senza preparazione del campione o fissazione chimica, evitando così perdita di informazioni.

Principi di base

Durante una scansione tomografica l'oggetto viene colpito dai raggi X. I raggi, dopo aver attraversato l'oggetto, vengono raccolti da un rilevatore (*Figura 13*). Vengono eseguite proiezioni bidimensionali in serie, di solito ad un incremento angolare fisso. Dalla totalità delle proiezioni raccolte, vengono ricostruite le "slices" tomografiche, ovvero le immagini della struttura interna dell'oggetto in piani paralleli alla direzione di propagazione dei raggi X. L'impilamento delle slices tomografiche consente la ricostruzione 3D del campione in esame.

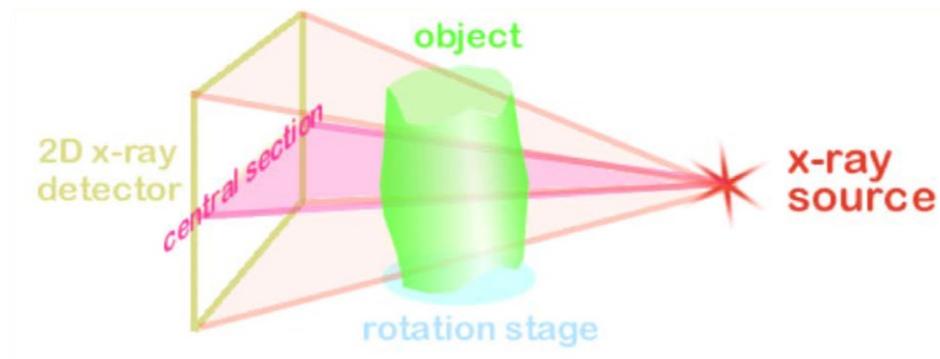


Figura 13 - Rappresentazione grafica del principio di funzionamento della tomografia

(<https://www.microphotonics.com/how-does-a-microct-scanner-work/>)

La μ -CT è simile alla tomografia computerizzata convenzionale di solito impiegata nella diagnosi medica e nella ricerca applicata industriale. Tuttavia, a differenza di questi sistemi, che generalmente hanno una risoluzione spaziale massima di circa 0,5 mm, la μ -CT è in grado di raggiungere una risoluzione spaziale fino a 0,3 μ m, ovvero circa tre ordini di grandezza più alti (Rominu *et al.*, 2014).

Il principio su cui si basa la formazione dell'immagine può essere dovuto all'assorbimento dei fotoni da parte del campione oppure al contrasto di fase nel passaggio di questi attraverso i diversi tessuti. Nell'*imaging* a raggi X convenzionale, la formazione dell'immagine si basa sulle differenze nell'assorbimento dei raggi X da parte dei diversi tessuti, ovvero le strutture dense come le ossa assorbono più dei tessuti molli; pertanto la μ -CT si basa sulla mappatura del coefficiente di attenuazione lineare dei raggi X che attraversano il campione esaminato e l'attenuazione dipende dalla composizione e densità dell'oggetto.

Grazie alla capacità di penetrazione dei raggi X, la μ -CT consente l'acquisizione non distruttiva di informazioni fondamentali sul restauro dentale, indipendentemente dalla forma o dalle dimensioni del campione, analizzando il comportamento del materiale in una data configurazione geometrica, come la cavità dentale. Le immagini 3D di μ -CT ad alta risoluzione spaziale rendono possibile la visualizzazione anche di piccoli dettagli della struttura.

La tecnica della μ -CT si è dimostrata molto efficace per consentire una valutazione qualitativa e quantitativa nelle tre dimensioni delle diverse strutture dentali, fornendo dati volumetrici senza la necessità di preparare il campione.

In particolare, in questa tesi è stata applicata come strumento di valutazione della densità minerale dei tessuti duri dentali al fine di valutarne la demineralizzazione e la remineralizzazione.

3.2 Microscopio elettronico a scansione

La microscopia elettronica a scansione (SEM) è una tecnica basata sulla microscopia, che consente di ottenere informazioni qualitative sulla morfologia dei campioni grazie alla sua capacità di creare immagini ad alta risoluzione di superfici dure (Wang *et al.*, 2013). Il SEM rappresenta uno strumento importante per la ricerca in odontoiatria, poiché si presta allo studio della microstruttura del tessuto dentale, come smalto e dentina.

Principi di base

A differenza del microscopio ottico, che si basa su un fascio di luce per la visualizzazione dell'oggetto, il microscopio elettronico sfrutta un fascio di elettroni che attraversa il corpo. La risoluzione di uno strumento di imaging dipende principalmente dalla lunghezza d'onda della particella utilizzata come sonda. Grazie alla lunghezza d'onda degli elettroni, di molto inferiore rispetto a quella dei fotoni, il potere di risoluzione del microscopio elettronico è nettamente superiore rispetto a quella del microscopio ottico, di circa 1000 volte. Inoltre, anche la profondità di campo di un microscopio elettronico a scansione (SEM) è molto più elevata, consentendo immagini perfette anche per campioni con spessore elevato.

La sorgente di elettroni di un SEM può essere un filamento di tungsteno, oppure nei SEM da banco più sensibili e performanti un filamento di Esaboruro di Lantanio o di Cerio. Il campione viene mantenuto sottovuoto per evitare che l'aria disturbi la creazione del fascio di elettroni. Il campione deve essere conduttivo, altrimenti produrrebbe cariche elettrostatiche che disturberebbero la rilevazione del segnale. Nel caso di campioni non conduttivi, come gli elementi dentali per il nostro studio, essi possono essere ricoperti da particelle metalliche (Sputter Coater) con degli strumenti specifici.

Nel SEM, il campione viene sottoposto ad una scansione riga per riga con il fascio di elettroni su un'area specifica. Il fascio elettronico viene quindi scansionato e trasformato in segnale televisivo; il risultato è quello di una immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo (Leonard, Chandler and Seraphin, 2012).

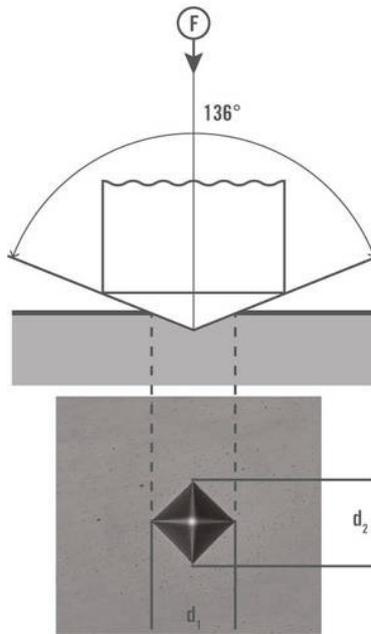
Le immagini ottenute al SEM mostrano una scala di grigi in corrispondenza alla tipologia del materiale analizzato: infatti, la penetrazione del fascio di elettroni varia in funzione al numero atomico dell'elemento, o meglio, è maggiore in materiali più leggeri (immagini più scure) e minore in materiali più pesanti (immagini più chiare). In questo studio, il SEM viene utilizzato per valutare la forma e la dimensione dei possibili gap presenti sulla superficie, il materiale composito e i tessuti dentari.

3.3 Microdurezza – Vickers

I test di microdurezza sono comunemente usati per studiare le proprietà fisiche dei materiali e sono ampiamente utilizzati per misurare la durezza dei denti. Questo metodo è facile, veloce e richiede solo una piccola area di superficie del campione per i test (Chuenarrom, Benjakul and Daosodsai, 2009).

Il test di indentazione Vickers è un metodo comunemente utilizzato per caratterizzare la durezza dei materiali, generalmente non è distruttivo e può essere ripetuto molte volte. Come tutti i test meccanici, sono soggetti a grandi fluttuazioni statistiche, che sono importanti per essere valutate. La funzione di distribuzione di probabilità della durezza Vickers è stata riportata in letteratura per corrispondere a una gaussiana (o legge normale), una normale logaritmica o una distribuzione di Weibull (Schneider, Bigerelle and Iost, 1999).

Nei test di microdurezza Vickers, un penetratore diamantato piramidale con un angolo di inclinazione di 136° viene impresso su una superficie a un carico noto per un periodo di tempo noto. L'area della rientranza rimanente, dopo la rimozione del diamante, viene calcolata dalla larghezza dell'impronta rimanente (*Figura 14*) (Lopez, 1993).



$$HV = \text{constant} \times \frac{\text{test force } F}{\text{surface of the indentation}} = 0,102 \times \frac{2F \sin \frac{136^\circ}{2}}{d^2} = 0,1891 \times \frac{F}{d^2}$$

$$d = \frac{d_1 + d_2}{2} \text{ (average diagonal length)}$$

Figura 14 – Rappresentazione grafica del test di microdurezza Vickers e formula

(<https://www.emcotest.com/it/il-mondo-della-prova-di-durezza/nozioni-sulla-durezza/teoria-della-prova-di-durezza/vickers/svolgimento-della-prova-di-durezza-vickers/>)

3.4 Microspettroscopia Raman

Il termine spettroscopia vibrazionale comprende la spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FTIR) e la microspettroscopia Raman (RMS). Queste tecniche sono strumenti analitici ben valutati per la caratterizzazione della composizione chimica di composti/materia e sono utilizzate per studiare un'ampia varietà di campioni, in piccole quantità e in diversi stati fisici, inclusi tessuti, cellule e fluidi biologici (Das and Agrawal, 2011; Baker, Mantz and Chiu, 2014; Notarstefano et al., 2021). Sono definiti label-free e non distruttivi, in quanto non richiedono alcun processo di fissazione e non distruggono il campione durante la misura.

Le spettroscopie infrarosse (IR) e Raman si basano sull'interazione tra la materia e un'opportuna radiazione elettromagnetica; infatti, un legame chimico può essere associato ad un oscillatore armonico con valori quantizzati di energia vibrazionale e

l'interazione con un'opportuna radiazione elettromagnetica può provocare transizioni dal livello vibrazionale fondamentale al primo eccitato. L'analisi di queste transizioni fornisce informazioni affidabili sui gruppi funzionali, all'interno dei materiali analizzati ('Surface-Enhanced Raman Scattering and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering', 2005; Gerald, 2020).

Poiché la spettroscopia IR è una tecnica di assorbimento, la radiazione elettromagnetica viene assorbita dal campione provocando specifiche transizioni vibrazionali che vengono riportate come picchi in un diagramma xy, definito spettro: lungo l'asse x, i numeri d'onda a cui avvengono le transizioni, e quindi sono riportate le posizioni dei picchi, mentre l'asse delle ordinate descrive l'intensità dell'assorbimento.

Negli anni '60, l'implementazione degli spettrometri IR con l'interferometro di Michelson (Figura 15) e la conseguente possibilità di convertire i dati IR dal dominio del tempo al dominio della frequenza, ha determinato uno sviluppo cruciale di questa tecnica, migliorando notevolmente la qualità degli spettri e accorciando il tempo delle misurazioni (*Infrared and Raman Spectroscopy*, 2018).

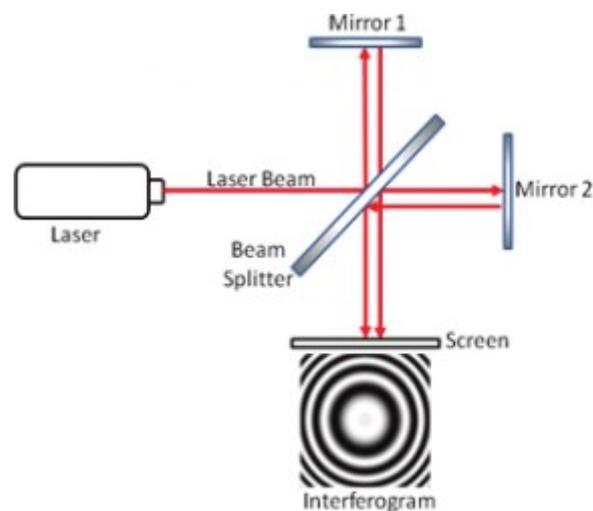


Figura 15 – Interferometro di Michelson

(<https://physicsopenlab.org/2020/05/16/interferometro-di-michelson-morley/>)

Le misure IR possono essere effettuate in trasmissione su campioni trasparenti alla radiazione, oppure in riflettanza nel caso di materiali solidi e/o non trasparenti.

In quest'ultimo caso, gli spettri IR vengono raccolti sfruttando l'accessorio Attenuated Total Reflectance, che si basa sull'analisi dell'onda evanescente che fuoriesce da un cristallo dedicato (diamante o ZnSe) e penetra nel materiale solo per pochi micrometri (Zhao, Blackburn and Brosseau, 2015).

La spettroscopia IR trova applicazione nella caratterizzazione di materiali biologici come tessuti o cellule (Giorgini *et al.*, 2018): infatti, grazie all'accoppiamento di spettrometri IR con microscopi ottici e opportuni array detector (MCT e FPA), è possibile combinare le informazioni derivanti dall'analisi morfologica del campione con la sua puntuale composizione chimica (Notarstefano *et al.*, 2020). IR è stato applicato anche per fornire preziose informazioni sulla struttura chimica dei tessuti dentali (Movasaghi, Rehman and ur Rehman, 2008; Reyes-Gasga *et al.*, 2013; Anwar Alebrahim *et al.*, 2014; Orsini *et al.*, 2021).

In alternativa, può essere studiata la regione del vicino IR da 14000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , dove si trovano gli armonici e le bande di combinazione (spettroscopia NIR). Gli spettrometri NIR hanno una configurazione simile a quelli applicati nella regione Mid IR.

Poiché la spettroscopia NIR è veloce, facile da eseguire e applicabile ad un'ampia varietà di campioni senza pretrattamento, ha molteplici applicazioni nella scienza e nell'industria (Blanco and Villarroya, 2002). La spettroscopia NIR è stata applicata anche in campo dentale per analizzare idrossiapatiti sintetiche, tessuti dentali duri umani e materiali dentali (Kolmas, Marek and Kolodziejcki, 2015).

Per quanto riguarda RMS, deve il suo nome al fisico indiano Sir Chandrashekhara Venkata Raman. Nel 1928 scoprì l'effetto Raman, grazie al quale vinse il premio Nobel nel 1930 (Raman and Krishnan, 1928; Das and Agrawal, 2011). Quando i fotoni con energia superiore alla differenza tra due livelli vibrazionali di una molecola entrano in collisione con essa, la maggior parte dell'energia passa attraverso, ma una piccola parte viene dispersa. Se, dopo l'applicazione dei fotoni, la molecola ritorna allo stesso stato energetico di prima dell'urto e i fotoni emessi hanno la stessa energia di quello incidente, lo scattering non fornisce informazioni sul campione, ed è detto scattering di Rayleigh (urto elastico). Quando invece i fotoni dispersi possiedono una frequenza diversa da quella incidente, si verifica un urto anelastico, e possono verificarsi due fenomeni: la molecola assorbe l'energia, e il fotone emesso ha un'energia minore di

quella incidente (scattering di Stokes), oppure la molecola perde energia, e il fotone emesso ha energia maggiore di quello incidente (scattering anti-Stokes).

4 PROTOCOLLO SPERIMENTALE

4.1 Obiettivo dello studio

Lo studio sperimentale condotto per questa tesi di Laurea si pone come obiettivo la valutazione del potenziale remineralizzante di tre dentifrici fluorati, presenti in commercio, applicati su denti estratti per ragioni ortodontiche o parodontali che presentano WSLs. Per simulare l'ambiente del cavo orale ed avere una valutazione il più attendibile possibile, è stato attuato il *pH cycling* che permette di ricreare le fluttuazioni fisiologiche del pH del cavo orale. Al termine del trattamento, i campioni sono stati esaminati mediante diverse tecniche di analisi come la microtomografia computerizzata, il microscopio elettrico a scansione, il test di microdurezza Vickers e la microspettroscopia Raman. Questo studio sperimentale potrà quindi essere utile nell'approccio clinico della gestione delle lesioni iniziali dello smalto.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Preparazione del campione

I campioni sono stati selezionati da un pool di denti estratti per ragioni ortodontiche o parodontali presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche dell'Università Politecnica delle Marche. I campioni che presentavano una WSL a livello vestibolare/interprossimale sono stati selezionati (n=4). I denti sono stati inglobati in un cilindro di resina acrilica (con dimensioni di 16 mm di altezza e 16 mm di diametro) con la WSL esposta (*Figura 16*) e conservati in una soluzione di cloramina allo 0.5%.



Figura 16 – A sinistra dente estratto con WSL visibile a livello interprossimale; a destra dente inglobato in resina acrilica

I campioni sono stati successivamente suddivisi in 4 gruppi e trattati con tre dentifrici contenenti ciascuno 1450ppm di F⁻ in diverse formulazioni (*Tabella 2*):

- **HAF** (idrossiapatite parzialmente sostituita con fluoro);
- **SMF** (monofluorofosfato di sodio con arginina);
- **SF** (fluoruro di sodio);
- **CTRL** (non trattato, sottoposto solo al *pH cycling*).

GRUPPO	TRATTAMENTO	Principio attivo	
HAF	Dente trattato con <i>CURASEPT BIOSMALTO – CARIE, ABRASIONE & EROSIONE</i>	Idrossiapatite parzialmente sostituita con fluoro; 1450 ppm F ⁻	
SMF	Dente trattato con <i>ELMEX PROFESSIONAL PROTEZIONE CARIE</i>	monofluorofosfato di sodio con arginina; 1450 ppm F ⁻	
SF	Dente trattato con <i>CURAPROX ENZYCAL 1450</i>	fluoruro di sodio; 1450 ppm F ⁻	
CTRL	Sottoposto solo al <i>pH cycling (CONTROLLO)</i>		

Tabella 2 – Dentifrici utilizzati per il trattamento contenenti ciascuno 1450 ppm F⁻ in diverse formulazioni. Gruppo CTRL (WSL sottoposta al *pH cycling*); Gruppo HAF (trattamento con dentifricio contenente HAF); Gruppo SMF (trattamento con dentifricio contenente SMF); Gruppo SF (trattamento con dentifricio contenente SF)

4.2.2 Trattamento del campione

pH cycling

Per simulare le fluttuazioni fisiologiche del pH che avvengono nel cavo orale, tutti i campioni sono stati sottoposti al ciclo del pH, suddiviso in 3 ore in agente demineralizzante e le restanti ore in agente remineralizzante. La soluzione remineralizzante è stata preparata come segue: 1.5 mM.L-1 calcium, 0.9 mM.L-1 phosphate, 150 mM.L-1 potassium chloride in 0.02 mM.L-1 cacodylic buffer, pH = 7.0; 0.02 $\mu\text{gF/mL}$ and 1 mL/mm²; mentre la composizione della soluzione demineralizzante è stata la seguente: 2.0 mM.L-1 calcium and phosphate in 75 mM.L-1 acetate buffer, pH = 4.7; 0.03 $\mu\text{gF/mL}$ and 3 mL/mm² (Fernandes *et al.*, 2021). Inoltre, nel passaggio tra soluzione demineralizzante e soluzione remineralizzante, i campioni sono stati lavati in acqua deionizzata (Figura 15).

Il ciclo del pH è stato eseguito per 7 giorni.



Figura 17 – pH cycling suddiviso in 24 ore). In rosso il tempo di permanenza in soluzione remineralizzante; in verde tempo di permanenza in soluzione demineralizzante. I trattamenti con agenti remineralizzanti sono stati applicati per due minuti, 2 volte al giorno (ore 9 e ore 14), come indicati dalla stella blu.

Trattamento con agenti remineralizzanti

Due volte al giorno (ore 9 e ore 14) i campioni sono stati sottoposti a trattamento con agente remineralizzante in base al gruppo assegnato (HAF, SMF e SF). Mentre, il gruppo CTRL è stato sottoposto solo al ciclo del pH.

Per il trattamento con agente remineralizzante è stato preparato uno *slurry* (Figura 18), composto da soluzione remineralizzante e pasta dentifricia, in rapporto di 3:1. Quindi, al dentifricio, in quantità *pea size*, è stata aggiunta la soluzione remineralizzante per il triplo della quantità e il tutto è stato mescolato con una spatola fino al raggiungimento di una soluzione omogenea.

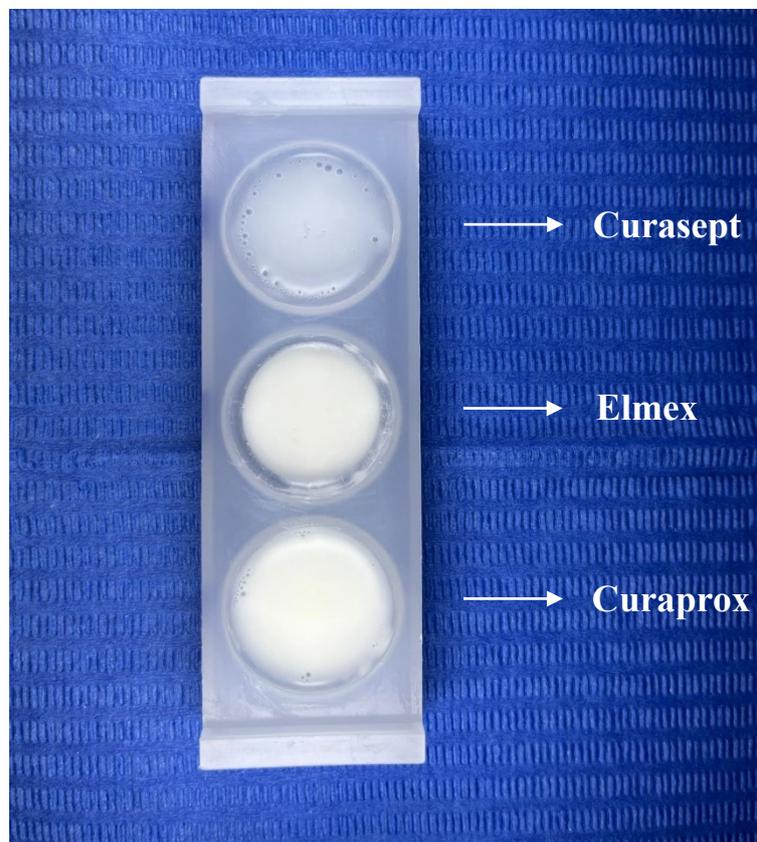


Figura 18 - Slurries

Questo permette di simulare ciò che accade nel cavo orale quando il dentifricio si amalgama con la saliva durante l'igiene orale domiciliare. In seguito, lo *slurry* è stato applicato sul dente, in particolare in corrispondenza della WSL, e spazzolato con lo spazzolino Curaprox 5460 per 2 minuti (Figura 19).



Figura 19

Una volta terminata questa procedura, i campioni sono stati sciacquati con H₂O deionizzata ed hanno continuato il *pH cycling*.

Tutti i campioni sono stati analizzati prima e dopo il trattamento attraverso le seguenti tecniche analitiche: RMS, VHM e μ -CT. Inoltre, dopo aver eseguito le analisi post trattamento i campioni sono stati sottoposti all'analisi SEM. Le analisi sono state condotte in collaborazione con il Dipartimento DISVA e CISMiN dell'Università Politecnica delle Marche.

4.2.3 Analisi strumentali

Microspettroscopia Raman

Per quanto riguarda la Microspettroscopia Raman, è stato utilizzato il microspettrometro Horiba Jobin-Yvon XploRA Nano Raman, dotato di un laser a diodi da 785 nm. Tutte le misurazioni sono state acquisite utilizzando un obiettivo 5x (Olympus, Tokyo, Giappone). Lo spettrometro è stato calibrato sulla linea di silicio da 520,7 cm⁻¹ prima dell'acquisizione spettrale. È stato scelto l'intervallo spettrale da 650 a 1800 cm⁻¹ e gli spettri sono stati acquisiti per 3×10 s in ciascun punto. In ogni area sono stati ricavati gli spettri, che sono successivamente stati elaborati, analizzando principalmente l'area della banda centrata a 960 cm⁻¹ assegnato al gruppo

PO_4^{3-} dell'idrossiapatite e la larghezza a metà del massimo della banda centrata a 960 cm^{-1} (FWHM960), indice di cristallinità (inversamente proporzionale a FWHM960). Ogni campione è stato scansionato individualmente per mezzo di un sistema di tomografia microcomputerizzata (μ -CT) Bruker SkyScan 1174 (SkyScan-Bruker, Anversa, Belgio). Le impostazioni della proiezione erano le seguenti: tensione di accelerazione 50 kV; corrente del raggio 800 μA ; filtro in alluminio da 1 mm; dimensione pixel 13,8 μm e rotazione 180° in passi di $0,3^\circ$ con un tempo di esposizione di 10 s per proiezione. Il tempo medio di scansione è stato di 5 ore. Il numero totale di sezioni ricostruite per ciascun campione era di circa 830, ottenendo informazioni assiali di circa 12 mm di spessore del dente. Le proiezioni dei denti sono state convertite in sezioni trasversali dal software NRecon (versione 1.6.10.2, Bruker, Billerica, MA, USA).

Microtomografia computerizzata

La densità minerale (MD) è stata quantificata seguendo il protocollo proposto da Schwass et al. (Schwass *et al.*, 2009). Il profilo della scala dei grigi è stato ottenuto utilizzando tre dischi di idrossiapatite con densità minerali note posizionati e fissati vicino ai campioni durante la sessione di imaging. La visualizzazione e la codifica dei colori sono state eseguite utilizzando la mappa dei colori Jet nel programma GNU Image Manipulation Program (GIMP Image-2.10). I cambiamenti nella perdita di minerali e nella profondità della lesione sono stati analizzati nei diversi gruppi.

Microdurezza

La microdurezza superficiale di tutti i campioni è stata misurata utilizzando il test di microdurezza Vickers (VMH) Remet HX-1000 (Remet S.A.S., Casalecchio di Reno, Italia). Su ciascuna area selezionata sono state eseguite tre indentazioni utilizzando un diamante a forma piramidale caricato con 200 g per 15 sec; la distanza tra un'impronta e l'altra era di circa 100 μm . Dopo aver rimosso il carico, i valori delle diagonali di indentazione sono stati valutati utilizzando un microscopio; l'area della indentatura è stata ottenuta e utilizzata per determinare il corrispondente valore di durezza. Quindi è stata calcolata la media dei tre valori.

Microscopio elettronico a scansione

Al termine del trattamento, i campioni sono stati montati su supporti di alluminio, dorati e quindi osservati al microscopio elettronico a scansione TESCAN VEGA 3 LMU. Sono state acquisite immagini SEM per valutare la micro-morfologia superficiale dello smalto e ad ingrandimento di 7000x.

4.2.4 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando ANOVA unidirezionale, seguita da t-Test, utilizzando il pacchetto software statistico Prism6 (Graphpad Software, Inc. USA). La significatività statistica è stata fissata a $p < 0.05$. Il software MS Office Excel è stato utilizzato per il calcolo dei coefficienti di correlazione e delle equazioni di regressione dei livelli di grigio dei dischi di idrossiapatite con le loro densità note.

4.3 Risultati

Le analisi sono state eseguite sulla base di un approccio multidisciplinare, basato sull'utilizzo di tecniche analitiche ad alta risoluzione.

Per ogni campione sono stati acquisiti gli spettri Raman nell'intervallo spettrale 650 a 1800 cm^{-1} prima e dopo il trattamento delle WSLs con dentifrici fluorati. In *Figura 20* sono riportati e confrontati per ciascun gruppo i profili spettrali pre e post trattamento. Dalla valutazione spettrale del gruppo controllo (CTRL), che è stato sottoposto esclusivamente al *pH cycling*, emerge che il gruppo fosfato, rappresentato dal picco più alto dello spettro (banda a 960 cm^{-1}), si è leggermente ridotto. Al contrario, nei gruppi test (HAF, SMF e SF), il picco del gruppo fosfato è aumentato in altezza dopo il trattamento.

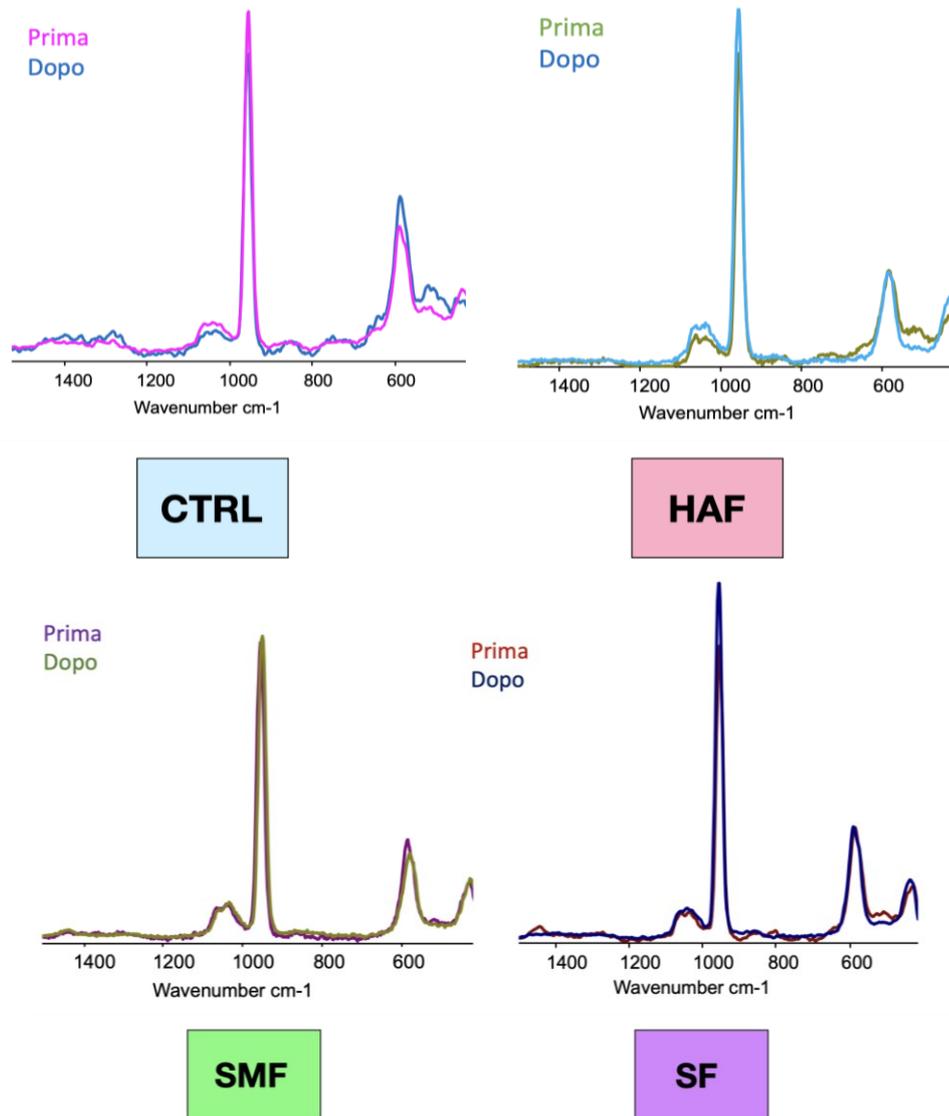


Figura 20 - Profili spettrali Raman delle WSLs prima e dopo il trattamento con dentifrici fluorati dei seguenti Gruppi: Gruppo CTRL (WSL sottoposta al pH cycling); Gruppo HAF (trattamento con dentifricio contenente HAF); Gruppo SMF (trattamento con dentifricio contenente SMF); Gruppo SF (trattamento con dentifricio contenente SF).

Nella *Figura 21* sono rappresentati graficamente i valori di cristallinità prima e dopo il trattamento delle WSLs con i dentifrici. La cristallinità viene calcolata come l'inverso dell'ampiezza di metà banda (FWHM₉₆₀); pertanto, un aumento dei valori corrisponde ad un decremento di cristallinità e viceversa. Il gruppo CTRL ha mostrato una ridotta cristallinità dopo il *pH cycling*, per i gruppi HAF e SF i valori del post

trattamento sono aumentati, mentre per il gruppo SMF i valori sono rimasti pressoché invariati.

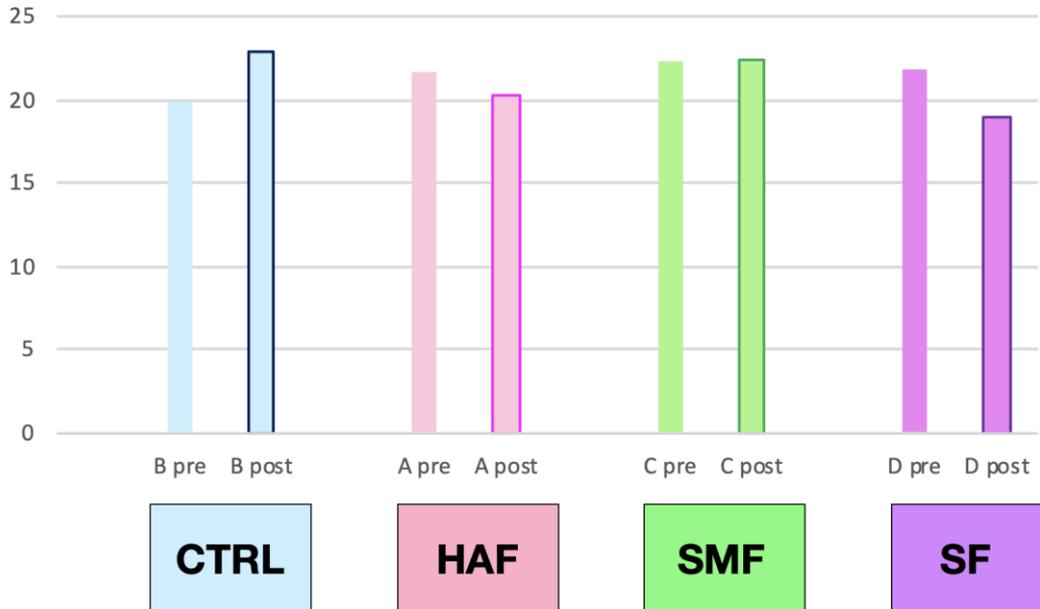


Figura 21 - Valori di cristallinità pre e post trattamento

Per quanto riguarda l'analisi μ -CT, le WSL analizzate hanno mostrato un'ampia variazione di forma e dimensione. Un taglio sagittale di un campione rappresentativo mostra nella *Figura 22* una WSL localizzata nel margine esterno dello smalto con forma lunare (cerchio rosso). L'immagine in falsi colori della *Fig. 22* evidenzia chiaramente una diversa densità minerale nella WSL rispetto allo smalto sano. La densità minerale è stata calcolata con l'equazione $MD = 0.0064X + 1.5815$ (*Fig. 22*). Il valore di X è stato eseguito sulla base della scala dei livelli di grigio proposta da Tu et al. (Tu *et al.*, 2019). Per quanto riguarda la WSL, l'entità dell'aumento della densità minerale varia tra le lesioni e anche a seconda dei diversi punti all'interno di una singola lesione (Huang *et al.*, 2007). Pertanto, è stata eseguita la media di 3 punti per ciascuna lesione in ciascun gruppo e l'analisi statistica eseguita su questi risultati ha rivelato una differenza significativa tra i valori di densità minerale ($p < 0.05$) (*Figura 23*). In particolare, il gruppo CTRL ha evidenziato un valore di MD prima del trattamento pari a 1.97 ± 0.4 e di 1.82 ± 0.1 dopo il trattamento; in HAF e SF i valori di

MD sono aumentati rispettivamente passando da 2.05 ± 0.03 e 2.15 ± 0.08 a 2.37 ± 0.04 e 2.53 ± 0.091 ; in SMF i valori di MD sono passati da 1.98 ± 0.1 a 2.14 ± 0.07 .

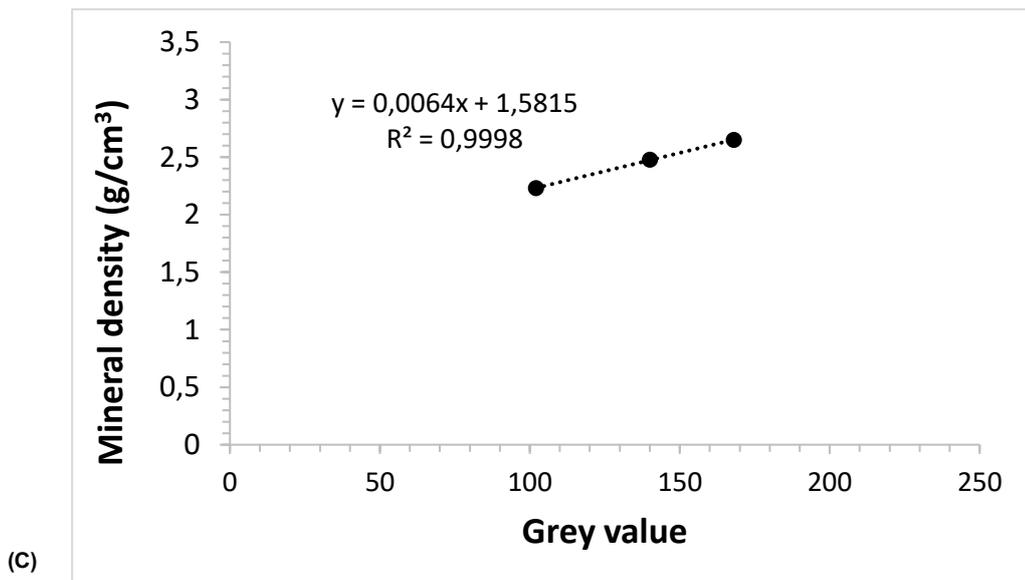
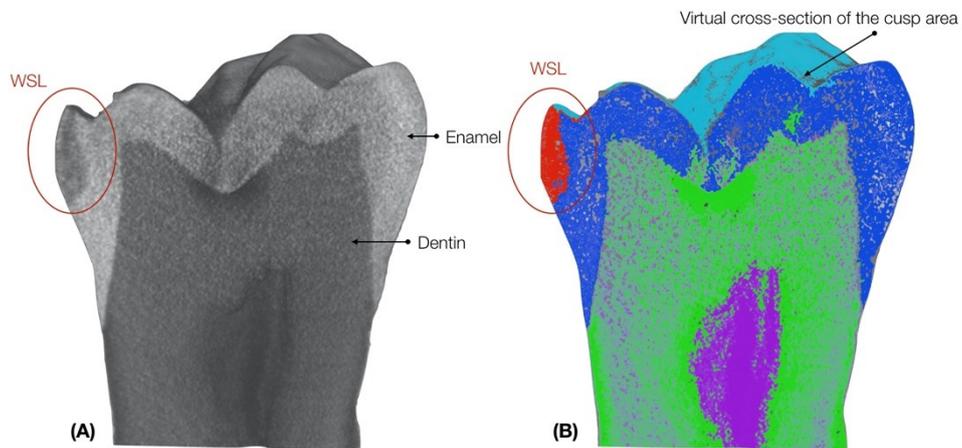


Figura 22 - (A) Immagine della sezione trasversale sagittale dell'immagine μ -CT ricostruita del campione. WLS è apparso come una regione di forma triangolare leggermente più scura sul lato sinistro dell'immagine. (B) Sono stati utilizzati falsi colori per evidenziare meglio le differenze di densità minerale. (C) Valore grigio vs Equazione di calibrazione della densità minerale dai tre dischi di idrossiapatite.

Pertanto, il gruppo SF ha mostrato il valore di densità minerale più alto dopo il trattamento nei gruppi test, tendente maggiormente ai valori di MD dello smalto sano, riportati dalla letteratura scientifica (2.74 ± 0.08 MD) (Huang *et al.*, 2007).

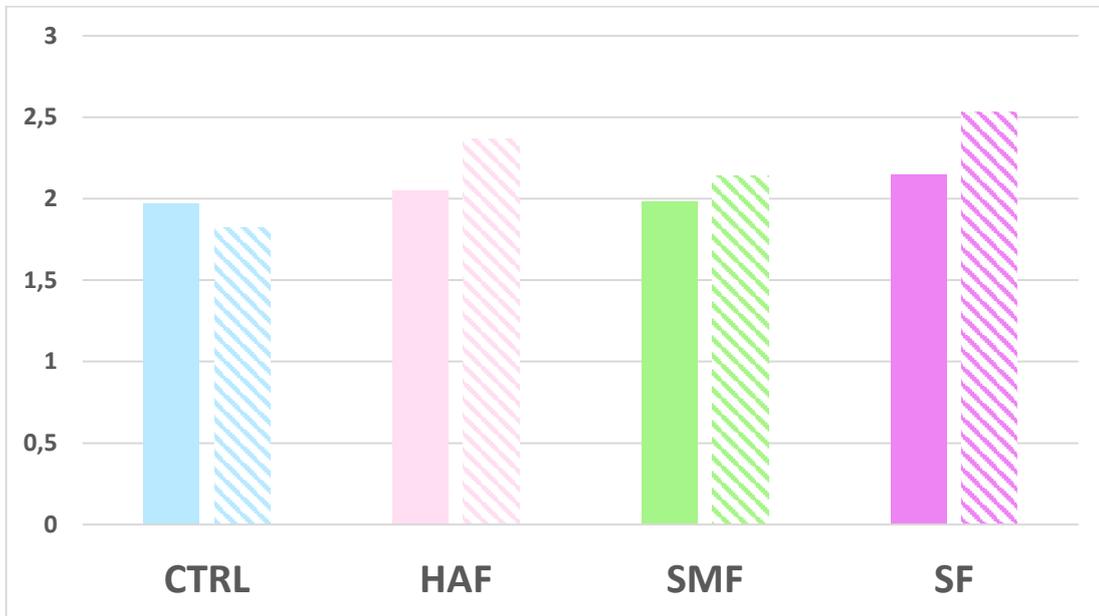


Figura 23 - Valori medi della densità minerale (MD) prima (barra colorata) e dopo il trattamento (barra a righe). CTRL: gruppo controllo; HAF: gruppo trattato con idrossiapatte parzialmente sostituita con fluoro; gruppo SMF: trattato con monofluorofosfato di sodio; gruppo SF: trattato con fluoruro di sodio.

L'analisi SEM della micro-morfologia di superficie dello smalto ha mostrato notevoli differenze tra i gruppi. Il gruppo CTRL ha mostrato una leggera rugosità con lieve irregolarità della superficie dello smalto e perdita della sostanza interprismatica. I gruppi HAF e SMF hanno mostrato una superficie dello smalto più omogenea con aspetto tipico dello smalto prismatico, con zone prismatiche ed interprismatiche ben ricostituite. Il gruppo SF ha evidenziato una totale riorganizzazione della struttura con aspetto tipico dello smalto sano (*Figura 24*).

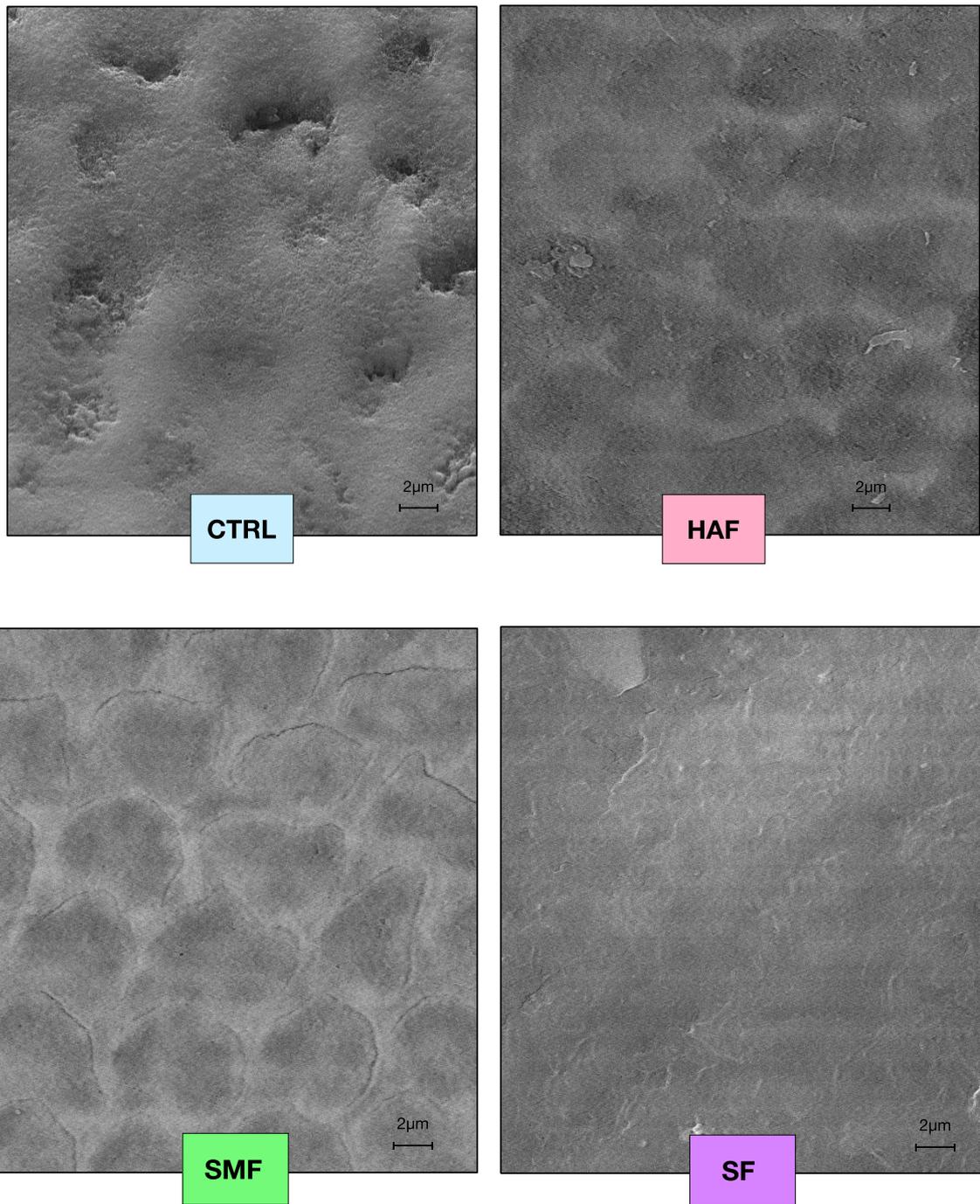


Figura 24 - Micrografie SEM ad ingrandimento 7000x. Smalto con WSL dopo ciclo del pH senza agenti remineralizzante (CTRL); smalto con WSL dopo trattamento con dentifricio contenente HAF (HAF); smalto con WSL dopo trattamento con dentifricio contenente SMF (SMF); smalto con WSL dopo trattamento con dentifricio contenente SF (SF).

4.4 Discussione

La remineralizzazione delle lesioni cariose iniziali può essere considerata un mezzo preventivo e un approccio terapeutico in odontoiatria restaurativa.

Sebbene siano state suggerite numerose strategie per trattare e arrestare le WSLs, nessun trattamento specifico è stato identificato come soluzione perfetta per questo problema. Tuttavia, supportati da più di mezzo secolo di ricerca, i benefici dei dentifrici al fluoro sono fermamente stabiliti. Gli studi, infatti, forniscono una chiara evidenza che i dentifrici al fluoro, ampiamente utilizzati da oltre 3 decenni, sono un trattamento di riferimento nella prevenzione della carie (V. C. Marinho *et al.*, 2003).

Nel presente studio preliminare è stato valutato il potenziale di remineralizzazione di tre differenti dentifrici a base di fluoro, disponibili in commercio, sulle WSLs naturali, dopo 7 giorni di trattamento. Le analisi sono state eseguite attraverso un approccio multidisciplinare, basato su tecniche analitiche ad alta risoluzione quali RMS, SEM, μ -CT e VMH, al fine di valutare rispettivamente le caratteristiche chimiche, microstrutturali, la densità minerale e la microdurezza.

Al fine di riprodurre ciò che si verifica da un punto di vista chimico nel cavo orale, è stato utilizzato il *pH cycling* proposto da Featherstone *et al.* (1986) e in seguito modificato da ten Cate e Duijsters (1982) (Featherstone *et al.*, 1988; ten Cate and Duijsters, 1982).

Diversi modelli di ciclo del pH sono stati sviluppati e descritti in letteratura nel corso degli anni; tuttavia, il ciclo del pH utilizzato è stato precedentemente testato e approvato per la valutazione della remineralizzazione netta delle lesioni cariose precoci (Amaechi, 2019; Queiroz *et al.*, 2008). Il *pH cycling* è utilizzato in quanto simula le fluttuazioni acide che avvengono nella cavità orale, provocando eventi di demineralizzazione e remineralizzazione (Ana Caroline Fumes *et al.*, 2016). Questa tecnica è stata ideata per imitare la dinamica della perdita e del guadagno di minerali durante la formazione della carie (Yu *et al.*, 2017), al fine di testare l'efficacia degli agenti remineralizzanti (Buzalaf *et al.*, 2010).

Le procedure di spazzolamento, utilizzate in questo studio, sono state eseguite spazzolando i campioni con dentifricio/soluzione remineralizzante in sospensione per 120 s, considerati come tempo di contatto totale della sospensione, due volte al giorno

(Tschoppe *et al.*, 2011). Al fine di riprodurre il più fedelmente possibile ciò che avviene nella pratica quotidiana, in cui il dentifricio è diluito nella secrezione salivare (Duke and Forward, 1982), una parte di pasta dentifricia è stata sciolta in tre parti di soluzione remineralizzante per ottenere una sospensione omogenea, come proposto da Tschoppe *et al.* (Tschoppe *et al.*, 2011). Come precedentemente sottolineato, i prodotti contenenti fluoro hanno proprietà remineralizzanti, soprattutto nelle lesioni iniziali dello smalto (Fernandes *et al.*, 2021). Dai risultati ottenuti è emerso che SF e HAF, dopo 7 giorni di trattamento, hanno mostrato capacità comparabili nel recupero della microdurezza, mostrando un buon potenziale remineralizzante sia da un punto di vista di MD che chimico, rispetto a SMF.

Il test di microdurezza Vickers è uno dei metodi più comunemente usati e affidabili per valutare le variazioni di mineralizzazione sui tessuti duri dentali (Bergstrand, 2011). Infatti, la determinazione della microdurezza è correlata alla resistenza dello smalto risultante dalla combinazione della densità minerale della struttura dello smalto stesso. I valori di VMH sono stati misurati in questo studio prima e dopo il trattamento. Tutti i gruppi test hanno dimostrato un aumento nei valori di microdurezza, specialmente nei gruppi HAF e SF ($p < 0.05$).

Un altro parametro utilizzato per valutare la remineralizzazione è stato la densità minerale (MD), tramite l'utilizzo della μ -CT. Infatti, la MD è stata considerata un parametro standard per la determinazione della demineralizzazione e remineralizzazione nella carie dentale, e quindi fornisce informazioni sui cambiamenti dinamici associati al modello di distribuzione spaziale tridimensionale del minerale all'interno delle lesioni cariose. La MD dello smalto sano in questo studio rientrava nell'intervallo riportato in letteratura di 2,37–3,10 g/cm³ (Huang *et al.*, 2007; Farah *et al.*, 2010). I valori di MD delle WSL prima del trattamento sono risultati essere significativamente inferiori rispetto al valore dello smalto sano, risultati coerenti con quanto riportato dalla letteratura scientifica (Huang *et al.*, 2007; Farah *et al.*, 2010).

Le differenze nella MD, riscontrate principalmente tra SF e HAF rispetto a C-SMF, potrebbero essere attribuite al diverso principio attivo e meccanismo d'azione di ciascun trattamento. Alcuni studi riportano che non vi sono differenze statisticamente significative in termini di remineralizzazione tra agenti a base di nanoidrossiapatite

associata al fluoro e agenti al fluoruro di sodio (Najibfard *et al.*, 2011; Itthagaran, King and Cheung, 2010).

Poiché si può verificare una variabilità nella MD in diverse aree dei campioni, è stata applicata l'analisi RMS per confermare i risultati ottenuti e valutare altri indici di remineralizzazione. Le bande degli spettri osservate sono in linea con quelle della letteratura scientifica per quanto riguarda i tessuti duri dentali (Orilisi *et al.*, 2021). Il valore MD inferiore nel gruppo CTRL rispetto ai gruppi SF, HAF e SMF è correlato a una riduzione dei gruppi fosfato e carbonato. In particolare, analizzando l'intensità della banda 1960 cm^{-1} (relativa al gruppo PO_4^{3-}), dopo il trattamento, questa tende a ridursi nel gruppo CTRL, mentre aumenta nei gruppi SF e HAF e resta all'incirca invariata nel gruppo SMF. Da questi risultati emerge che il *pH cycling* tende in piccola parte a demineralizzare la lesione iniziale, tanto che nel gruppo CTRL, sottoposto solo al *pH cycling*, questa banda tende a ridursi, mentre in tutti i gruppi test tende ad aumentare, indicando una remineralizzazione dal punto di vista chimico.

La cristallinità, correlata al grado di ordine dei cristalli di idrossiapatite nella struttura dello smalto, indice di mineralizzazione, è calcolata come l'inverso dell'ampiezza di metà banda della banda 960cm^{-1} . Secondo i nostri risultati, l'utilizzo di SF e HAF aumenta significativamente la cristallinità della lesione, migliorandone la mineralizzazione ($p < 0.05$).

I risultati ottenuti sono in linea con alcuni studi clinici, in cui è stato evidenziato che i trattamenti con agenti remineralizzanti a base di nanoidrossiapatite hanno dimostrato potenziale remineralizzante paragonabile a trattamenti a base di fluoro (Najibfard *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2018).

Dal punto di vista microstrutturale, le micrografie al SEM hanno dimostrato differenze qualitative nei diversi gruppi. In particolare, tutti i gruppi test hanno mostrato un buon ripristino della superficie dello smalto, con riduzione delle porosità; tuttavia i risultati più soddisfacenti sono stati riscontrati nel gruppo SF in cui c'è stato un completo ripristino della sostanza interprismatica e dei prismi di idrossiapatite, con una struttura paragonabile a quella dello smalto sano, anche dopo 7 giorni di trattamento.

4.5 Conclusioni

L'era dell'odontoiatria preventiva e minimamente invasiva impone la necessità di sviluppare nuovi approcci per remineralizzare le lesioni dello smalto. I risultati ottenuti da questo studio *in vitro* evidenziano le potenziali applicazioni degli agenti remineralizzanti contenuti nei dentifrici testati, per prevenire ed evitare danni ai tessuti dentali. In particolare, nelle WSLs lo smalto diventa meno mineralizzato a causa della diminuzione della densità minerale e dei gruppi fosfati e dell'aumento del contenuto di matrice organica. Dunque, l'utilizzo di dentifrici contenenti idrossiapatite parzialmente sostituita con fluoro, monofluorofosfato di sodio con arginina e fluoruro di sodio, ripristina la sostanza interprismatica e dei prismi di idrossiapatite, ottenendo una superficie paragonabile a quella dello smalto sano, sia dal punto di vista morfologico che strutturale.

Inoltre, presentano il vantaggio di essere utilizzati dai pazienti quotidianamente per la propria igiene orale domiciliare, possono essere considerati come un presidio efficace per il trattamento preventivo e terapeutico per le WSLs, soprattutto nei soggetti giovani e poco collaborativi.

Infine, questo lavoro rappresenta il punto di partenza per una futura valutazione degli effetti di diversi agenti remineralizzanti, poiché è necessario effettuare ulteriori studi, sia *in vitro* che *in vivo*, per valutare ed approfondire le conoscenze sul loro meccanismo di azione e sulle loro potenziali applicazioni.

BIBLIOGRAFIA

Abou Neel, E. *et al.* (2016) ‘Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone’, *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, pp. 4743–4763. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>.

Abreu, M.G.L. *et al.* (2020) ‘Dental trauma in primary dentition, its effect on permanent successors and on Oral Health-Related Quality of Life: a 4-year follow-up case report’, *International Journal of Burns and Trauma*, 10(5), pp. 201–209.

Al Dhubayb, S. *et al.* (2021) ‘Ability of Dentists and Students to Detect Caries by Using the International Caries Detection and Assessment System’, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 13, pp. 379–387. Available at: <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S324396>.

Algarni, A.A. *et al.* (2015) ‘The impact of stannous, fluoride ions and its combination on enamel pellicle proteome and dental erosion prevention’, *PloS One*, 10(6), p. e0128196. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128196>.

Almulhim, B. (2021) ‘Molar and Incisor Hypomineralization’, *Journal of Nepal Medical Association*, 59(235). Available at: <https://doi.org/10.31729/jnma.6343>.

Alqahtani, M.A. *et al.* (2021) ‘Effect of topical fluoride application and diode laser-irradiation on white spot lesions of human enamel’, *The Saudi Dental Journal*, 33(8), pp. 937–943. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2021.08.007>.

Alvarez, J.A., Celiberti, P. and Ciamponi, A.L. (2009) ‘Dental fluorosis: Exposure, prevention and management’, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. [Preprint].

Amaechi, B.T. (2019) ‘Protocols to Study Dental Caries In Vitro: pH Cycling Models’, in P. Papagerakis (ed.) *Odontogenesis*. New York, NY: Springer New York (Methods in Molecular Biology), pp. 379–392. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_34.

Ana Caroline Fumes *et al.* (2016) ‘Validation of pH cycling model to induce artificial carious lesions in bovine dentin’, *RSBO*, 12(3), pp. 266–71. Available at: <https://doi.org/10.21726/rsbo.v12i3.762>.

Anil, A., I. Ibraheem, W., *et al.* (2022) ‘Demineralization and Remineralization Dynamics and Dental Caries’, in L.-C. Rusu and L. Cosmina Ardelean (eds) *Dentistry*. IntechOpen. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.105847>.

Anil, A., Ibraheem, W.I., *et al.* (2022) ‘Nano-Hydroxyapatite (nHAp) in the Remineralization of Early Dental Caries: A Scoping Review’, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9), p. 5629. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph19095629>.

Anil, S. and Anand, P.S. (2017) ‘Early Childhood Caries: Prevalence, Risk Factors, and Prevention’, *Frontiers in Pediatrics*, 5, p. 157. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00157>.

- Anwar Alebrahim, M. *et al.* (2014) 'ATR-FTIR and Raman spectroscopy of primary and permanent teeth', *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 3(1), pp. 15–27. Available at: <https://doi.org/10.3233/BSI-130059>.
- Aref, N.S. and Alrasheed, M.Kh. (2022) 'Casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate and universal adhesive resin as a complementary approach for management of white spot lesions: an in-vitro study', *Progress in Orthodontics*, 23(1), p. 10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40510-022-00404-9>.
- Arifa, M.K., Ephraim, R. and Rajamani, T. (2019) 'Recent Advances in Dental Hard Tissue Remineralization: A Review of Literature', *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 12(2), pp. 139–144. Available at: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1603>.
- Arola, D.D. *et al.* (2017) 'The Tooth', *Dental Clinics of North America*, 61(4), pp. 651–668. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.05.001>.
- B K, A., R, Y. and Puranik, M.P. (2022) 'Remineralization of early enamel caries lesions using self-assembling peptides P11-4: Systematic review and meta-analysis', *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 12(3), pp. 324–331. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2022.03.012>.
- Baker, A.E., Mantz, A.R. and Chiu, M.L. (2014) 'Raman spectroscopy characterization of antibody phases in serum', *mAbs*, 6(6), pp. 1509–1517. Available at: <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.975100>.
- Bartlett, J.D. (2013) 'Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates', *ISRN Dentistry*, 2013, pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/684607>.
- Beniash, E. *et al.* (2019) 'The hidden structure of human enamel', *Nature Communications*, 10(1), p. 4383. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12185-7>.
- Bergstrand, F. (2011) 'A Review on Prevention and Treatment of Post-Orthodontic White Spot Lesions - Evidence-Based Methods and Emerging Technologies', *The Open Dentistry Journal*, 5(1), pp. 158–162. Available at: <https://doi.org/10.2174/1874210601105010158>.
- Blanco, M. and Villarroya, I. (2002) 'NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(4), pp. 240–250. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1).
- Blinkhorn, A. and Mekertichian, K. (2013) 'Fluoride and dental health', in *Handbook of Pediatric Dentistry*. Elsevier, pp. 63–78. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3695-9.00005-5>.
- Brown, J.P. and Dodds, M.W.J. (1998) 'Prevention Strategies for Dental Caries', in *Prevention in Clinical Oral Health Care*. Elsevier, pp. 196–212. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-03695-5.50019-7>.
- Burnheimer, J.M. *et al.* (2022) 'Prevalence of white spot lesions and risk factors associated with the COVID-19 pandemic', *Journal of the World Federation of Orthodontists*, 11(4), pp. 125–129. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejwf.2022.03.003>.

Buzalaf, M.A.R. *et al.* (2010) 'pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations', *Journal of Applied Oral Science*, 18(4), pp. 316–334. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1678-77572010000400002>.

Buzalaf, Marília Afonso Rabelo *et al.* (2011) 'Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control', in M.A.R. Buzalaf (ed.) *Monographs in Oral Science*. S. Karger AG, pp. 97–114. Available at: <https://doi.org/10.1159/000325151>.

Caeiro-Villasenín, L. *et al.* (2022) 'Developmental Dental Defects in Permanent Teeth Resulting from Trauma in Primary Dentition: A Systematic Review', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(2), p. 754. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph19020754>.

Campos, P.H. *et al.* (2022) 'Prevalence of White Spot Caries Lesions in Primary Teeth in Preschool Children: Systematic Review and Meta-analysis', *Current Pediatric Reviews*, 18(1), pp. 33–46. Available at: <https://doi.org/10.2174/1573396317666211202090657>.

Cardoso, A.-A. *et al.* (2020) 'A high salivary calcium concentration is a protective factor for caries development during orthodontic treatment', *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 12(3), pp. e209–e214. Available at: <https://doi.org/10.4317/jced.56331>.

ten Cate, J.M. and Duijsters, P.P. (1982) 'Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions', *Caries Research*, 16(3), pp. 201–210. Available at: <https://doi.org/10.1159/000260599>.

Cazzolla, A.P. *et al.* (2018) 'Efficacy of 4-year treatment of icon infiltration resin on postorthodontic white spot lesions', *BMJ Case Reports*, p. bcr-2018-225639. Available at: <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225639>.

Cheng, L. *et al.* (2022) 'Expert consensus on dental caries management', *International Journal of Oral Science*, 14(1), p. 17. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00167-3>.

Cheng, X. *et al.* (2017) 'Comparative effect of a stannous fluoride toothpaste and a sodium fluoride toothpaste on a multispecies biofilm', *Archives of Oral Biology*, 74, pp. 5–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.030>.

Chuenarrom, C., Benjakul, P. and Daosodsai, P. (2009) 'Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin', *Materials Research*, 12(4), pp. 473–476. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392009000400016>.

Coelho, A. *et al.* (2022) 'CAMBRA Protocol Efficacy: A Systematic Review and Critical Appraisal', *Dentistry Journal*, 10(6), p. 97. Available at: <https://doi.org/10.3390/dj10060097>.

Cosma, L.L. *et al.* (2019) 'Current treatment modalities of orthodontically induced white spot lesions and their outcome – a literature review', *Medicine and Pharmacy Reports*, 92(1), pp. 25–30. Available at: <https://doi.org/10.15386/cjmed-1090>.

Crawford, P.J., Aldred, M. and Bloch-Zupan, A. (2007) 'Amelogenesis imperfecta', *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2(1), p. 17. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-17>.

- Crombie, F.A. *et al.* (2013) ‘Characterisation of developmentally hypomineralised human enamel’, *Journal of Dentistry*, 41(7), pp. 611–618. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.05.002>.
- Crystal, Y.O. and Niederman, R. (2019) ‘Evidence-Based Dentistry Update on Silver Diamine Fluoride’, *Dental Clinics of North America*, 63(1), pp. 45–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.08.011>.
- Cvikl, B. *et al.* (2018) ‘Stannous chloride and stannous fluoride are inhibitors of matrix metalloproteinases’, *Journal of Dentistry*, 78, pp. 51–58. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.002>.
- Damian, L.-R. *et al.* (2022) ‘Impact of Dentistry Materials on Chemical Remineralisation/Infiltration versus Salivary Remineralisation of Enamel—In Vitro Study’, *Materials*, 15(20), p. 7258. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma15207258>.
- Darvell, B.W. (2018) ‘Surfaces’, in *Materials Science for Dentistry*. Elsevier, pp. 292–336. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101035-8.50010-9>.
- Das, R.S. and Agrawal, Y.K. (2011) ‘Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications’, *Vibrational Spectroscopy*, 57(2), pp. 163–176. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.08.003>.
- Davies, G.M. *et al.* (2001) ‘The use of fibre-optic transillumination in general dental practice’, *BRITISH DENTAL JOURNAL*, 191(3).
- Dawasaz, A.A. *et al.* (2022) ‘Effectiveness of Self-Assembling Peptide (P11-4) in Dental Hard Tissue Conditions: A Comprehensive Review’, *Polymers*, 14(4), p. 792. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym14040792>.
- Degli Esposti, L. *et al.* (2022) ‘Antimicrobial Activity of Remineralizing Ion-Doped Amorphous Calcium Phosphates for Preventive Dentistry’, *Frontiers in Materials*, 9, p. 846130. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmats.2022.846130>.
- DenBesten, P. and Li, W. (2011) ‘Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis’, in M.A.R. Buzalaf (ed.) *Monographs in Oral Science*. S. Karger AG, pp. 81–96. Available at: <https://doi.org/10.1159/000327028>.
- Denis, M. *et al.* (2013) ‘White defects on enamel: Diagnosis and anatomopathology: Two essential factors for proper treatment (part 1)’, *International Orthodontics*, 11(2), pp. 139–165. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ortho.2013.02.014>.
- Dikmen, B. (2015) ‘ICDAS II CRITERIA (INTERNATIONAL CARIES DETECTION AND ASSESSMENT SYSTEM)’, *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 49(3), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.17096/jiufd.38691>.
- Dirks, O.B. (1966) ‘Posteruptive Changes in Dental Enamel’, *Journal of Dental Research*, 45(3), pp. 503–511. Available at: <https://doi.org/10.1177/00220345660450031101>.
- Dixit, A. *et al.* (2021) ‘Analysis of Remineralization Potential of Three Different Remineralizing Pastes on Demineralized Enamel: A Comparative Study’, *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 22(8), pp. 939–942.

- Duke, S.A. and Forward, G.C. (1982) ‘The conditions occurring in vivo when brushing with toothpastes’, *British Dental Journal*, 152(2), pp. 52–54. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4804743>.
- Farah, R.A. *et al.* (2010) ‘Protein content of molar–incisor hypomineralisation enamel’, *Journal of Dentistry*, 38(7), pp. 591–596. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.04.012>.
- Farias, J.D.O. *et al.* (2022) ‘Microinvasive esthetic approach for deep enamel white spot lesion’, *Dental Research Journal* [Preprint].
- Farooq, I. and Bugshan, A. (2020) ‘The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review’, *F1000Research*, 9, p. 171. Available at: <https://doi.org/10.12688/f1000research.22499.3>.
- Featherstone, J.D.B. *et al.* (1988) ‘Effect of an Anticalculus Dentifrice on Lesion Progression under pH Cycling Conditions in vitro’, *Caries Research*, 22(6), pp. 337–341. Available at: <https://doi.org/10.1159/000261133>.
- Featherstone, J.D.B. (2009) ‘Remineralization, the Natural Caries Repair Process—The Need for New Approaches’, *Advances in Dental Research*, 21(1), pp. 4–7. Available at: <https://doi.org/10.1177/0895937409335590>.
- Featherstone, J.D.B. *et al.* (2021) ‘A Comparison of Four Caries Risk Assessment Methods’, *Frontiers in Oral Health*, 2, p. 656558. Available at: <https://doi.org/10.3389/froh.2021.656558>.
- Fernandes, N.L.S. *et al.* (2021) ‘Resistance against Erosive Challenge of Dental Enamel Treated with 1,450-PPM Fluoride Toothpastes Containing Different Biomimetic Compounds’, *European Journal of Dentistry*, 15(3), pp. 433–439. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1725576>.
- Ferreira Zandoná, A. *et al.* (2010) ‘Use of ICDAS Combined with Quantitative Light-Induced Fluorescence as a Caries Detection Method’, *Caries Research*, 44(3), pp. 317–322. Available at: <https://doi.org/10.1159/000317294>.
- Ferreira Zandoná, A.G., Ritter, A.V. and Eidson, R.S. (2019) ‘Dental Caries’, in *Sturdevant’s Art and Science of Operative Dentistry*. Elsevier, pp. 40–94. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47833-5.00002-2>.
- Fiorillo, L. *et al.* (2020) ‘Stannous Fluoride Effects on Enamel: A Systematic Review’, *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 5(3), p. 41. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomimetics5030041>.
- Fragelli, C.M.B. *et al.* (2015) ‘Molar incisor hypomineralization (MIH): conservative treatment management to restore affected teeth’, *Brazilian Oral Research*, 29(1), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0076>.
- Geraldes, C.F.G.C. (2020) ‘Introduction to Infrared and Raman-Based Biomedical Molecular Imaging and Comparison with Other Modalities’, *Molecules*, 25(23), p. 5547. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25235547>.

- Ghodastra, R. and Brizuela, M. (2022) 'Dental Caries Diagnostic Testing', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574510/> (Accessed: 28 February 2023).
- Gil-Bona, A. and Bidlack, F.B. (2020) 'Tooth Enamel and Its Dynamic Protein Matrix', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), p. 4458. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21124458>.
- Giorgini, E. *et al.* (2018) 'In vitro FTIR microspectroscopy analysis of primary oral squamous carcinoma cells treated with cisplatin and 5-fluorouracil: a new spectroscopic approach for studying the drug–cell interaction', *The Analyst*, 143(14), pp. 3317–3326. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8AN00602D>.
- Giuliani, A. and Cedola, A. (eds) (2018) *Advanced High-Resolution Tomography in Regenerative Medicine: Three-Dimensional Exploration into the Interactions between Tissues, Cells, and Biomaterials*. Cham: Springer International Publishing (Fundamental Biomedical Technologies). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00368-5>.
- Gomez, J. *et al.* (2013) 'In vitro performance of different methods in detecting occlusal caries lesions', *Journal of Dentistry*, 41(2), pp. 180–186. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.11.003>.
- Gomez, J. (2015) 'Detection and diagnosis of the early caries lesion', *BMC Oral Health*, 15(S1), p. S3. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S3>.
- Gonçalves, F.M.C. *et al.* (2018) 'Remineralizing effect of a fluoridated gel containing sodium hexametaphosphate: An in vitro study', *Archives of Oral Biology*, 90, pp. 40–44. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.03.001>.
- Guerra, F., Mazur, M., Nardi, G.M., *et al.* (2015) 'Dental hypomineralized enamel resin infiltration. Clinical indications and limits'.
- Guerra, F., Mazur, M., Corridore, D., *et al.* (2015) 'Evaluation of the Esthetic Properties of Developmental Defects of Enamel: A Spectrophotometric Clinical Study', *The Scientific World Journal*, 2015, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/878235>.
- Gugnani, N. and Pandit, I. (2011) 'International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept', *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 4(2), pp. 93–100. Available at: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1089>.
- Gumber, H.K. *et al.* (2022) 'Effect of a Stannous Fluoride Dentifrice on Biofilm Composition, Gene Expression and Biomechanical Properties', *Microorganisms*, 10(9), p. 1691. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091691>.
- Gupta, P. *et al.* (2013) 'Role of Sugar and Sugar Substitutes in Dental Caries: A Review', *ISRN Dentistry*, 2013, pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/519421>.
- Heymann, G.C. and Grauer, D. (2013) 'A Contemporary Review of White Spot Lesions in Orthodontics: White Spot Lesions in Orthodontics', *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 25(2), pp. 85–95. Available at: <https://doi.org/10.1111/jerd.12013>.

- Huang, T.T.Y. *et al.* (2007) 'Characterisation of enamel white spot lesions using X-ray micro-tomography', *Journal of Dentistry*, 35(9), pp. 737–743. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.06.001>.
- Iafisco, M. *et al.* (2018) 'Fluoride-doped amorphous calcium phosphate nanoparticles as a promising biomimetic material for dental remineralization', *Scientific Reports*, 8(1), p. 17016. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35258-x>.
- Indrapriyadharshini, K. *et al.* (2018) 'Remineralizing potential of CPP-ACP in white spot lesions - A systematic review', *Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 29(4), pp. 487–496. Available at: https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_364_17.
- Infrared and Raman Spectroscopy* (2018). Elsevier. Available at: <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00806-1>.
- Ismail, A.I. *et al.* (2007) 'The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries', *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 35(3), pp. 170–178. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2007.00347.x>.
- Ismail, A.I. *et al.* (2015) 'The International Caries Classification and Management System (ICCMS™) An Example of a Caries Management Pathway', *BMC Oral Health*, 15(S1), p. S9. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S9>.
- Itthagarun, A., King, N. and Cheung, Y.M. (2010) 'The effect of nano-hydroxyapatite toothpaste on artificial enamel carious lesion progression: An in-vitro pH-cycling study'.
- Iwasaki, M., Satou, R. and Sugihara, N. (2022) 'Development of Root Caries Prevention by Nano-Hydroxyapatite Coating and Improvement of Dentin Acid Resistance', *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(22), p. 8263. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma15228263>.
- Jakubovics, N.S. (2015) 'Saliva as the Sole Nutritional Source in the Development of Multispecies Communities in Dental Plaque', *Microbiology Spectrum*, 3(3). Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0013-2014>.
- Johnston, N.R. and Strobel, S.A. (2020) 'Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review', *Archives of Toxicology*, 94(4), pp. 1051–1069. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02687-5>.
- Karlinsey, R.L. *et al.* (2009) 'In vitro assessments of experimental NaF dentifrices containing a prospective calcium phosphate technology', *American Journal of Dentistry*, 22(3), pp. 180–184.
- Karlinsey, R.L. *et al.* (2010) 'Remineralization potential of 5,000 ppm fluoride dentifrices evaluated in a pH cycling model'.
- Khoroushi, M. and Kachuie, M. (2017) 'Prevention and treatment of white spot lesions in orthodontic patients', *Contemporary Clinical Dentistry*, 8(1), p. 11. Available at: https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_216_17.

- Kirsch, J. *et al.* (2019) 'Influence of pure fluorides and stannous ions on the initial bacterial colonization in situ', *Scientific Reports*, 9(1), p. 18499. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55083-0>.
- Kolmas, J., Marek, D. and Kolodziejski, W. (2015) 'Near-Infrared (NIR) Spectroscopy of Synthetic Hydroxyapatites and Human Dental Tissues', *Applied Spectroscopy*, 69(8), pp. 902–912. Available at: <https://doi.org/10.1366/14-07720>.
- Lacruz, R.S. *et al.* (2017) 'Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease', *Physiological Reviews*, 97(3), pp. 939–993. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>.
- Lam, R. (2016) 'Epidemiology and outcomes of traumatic dental injuries: a review of the literature', *Australian Dental Journal*, 61, pp. 4–20. Available at: <https://doi.org/10.1111/adj.12395>.
- Lee, J.D. *et al.* (2021) 'Comprehensive Management of Severe Dental Fluorosis with Adhesively Bonded All-Ceramic Restorations', *Prosthesis*, 3(3), pp. 194–208. Available at: <https://doi.org/10.3390/prosthesis3030020>.
- Leonard, D.N., Chandler, G.W. and Seraphin, S. (2012) 'Scanning Electron Microscopy', in E.N. Kaufmann (ed.) *Characterization of Materials*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. com081.pub2. Available at: <https://doi.org/10.1002/0471266965.com081.pub2>.
- Levy, F.M. *et al.* (2022) 'Characterization of white spot lesions formed on human enamel under microcosm biofilm for different experimental periods', *Journal of Applied Oral Science*, 30, p. e20210560. Available at: <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2021-0560>.
- Li, X. *et al.* (2014) 'The remineralisation of enamel: a review of the literature', *Journal of Dentistry*, 42 Suppl 1, pp. S12-20. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50003-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50003-6).
- Lignon, G. *et al.* (2015) 'L'émail: Un autoassemblage unique dans le monde du minéral', *médecine/sciences*, 31(5), pp. 515–521. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/20153105013>.
- Linde, A. and Goldberg, M. (1993) 'Dentinogenesis', *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 4(5), pp. 679–728. Available at: <https://doi.org/10.1177/10454411930040050301>.
- Lopatiene, K., Borisovaite, M. and Lapenaite, E. (2016) 'Prevention and Treatment of White Spot Lesions During and After Treatment with Fixed Orthodontic Appliances: a Systematic Literature Review', *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 7(2). Available at: <https://doi.org/10.5037/jomr.2016.7201>.
- Lopes, L.B. *et al.* (2021) 'The prevalence of molar-incisor hypomineralization: a systematic review and meta-analysis', *Scientific Reports*, 11(1), p. 22405. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01541-7>.
- Lopez, J. (1993) 'Microhardness testing of plastics: Literature review', *Polymer Testing*, 12(5), pp. 437–458. Available at: [https://doi.org/10.1016/0142-9418\(93\)90016-I](https://doi.org/10.1016/0142-9418(93)90016-I).

- Lynch, C.D. *et al.* (2010) ‘Gabriel-Philippe de la Hire and the discovery of Hunter-Schreger bands’, *British Dental Journal*, 209(9), pp. 461–465. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2010.980>.
- Lynch, C.D. *et al.* (2011) ‘Hunter-Schreger Band patterns and their implications for clinical dentistry’, *Journal of Oral Rehabilitation*, 38(5), pp. 359–365. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2010.02162.x>.
- Madléna, M. (2013) ‘Experiences with amine fluoride containing products in the management of dental hard tissue lesions focusing on Hungarian studies: a review’, *Acta Medica Academica*, 42(2), pp. 189–197. Available at: <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.86>.
- Marinho, V. C. *et al.* (2003) ‘Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents’, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2003(1), p. CD002278. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002278>.
- Marinho, Valeria CC *et al.* (2003) ‘Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents’, *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Preprint]. Edited by Cochrane Oral Health Group. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002782>.
- Martignon, S., Bartlett, D., *et al.* (2021) ‘Epidemiology of Erosive Tooth Wear, Dental Fluorosis and Molar Incisor Hypomineralization in the American Continent’, *Caries Research*, 55(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1159/000512483>.
- Martignon, S., Roncalli, A.G., *et al.* (2021) ‘Risk factors for dental caries in Latin American and Caribbean countries’, *Brazilian Oral Research*, 35(suppl 1), p. e053. Available at: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0053>.
- Mathur, V.P. and Dhillon, J.K. (2018) ‘Dental Caries: A Disease Which Needs Attention’, *Indian Journal of Pediatrics*, 85(3), pp. 202–206. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2381-6>.
- Meyer, F. *et al.* (2021) ‘Cariogenic Biofilms: Development, Properties, and Biomimetic Preventive Agents’, *Dentistry Journal*, 9(8), p. 88. Available at: <https://doi.org/10.3390/dj9080088>.
- Michaelis, J. *et al.* (2022) ‘Quantifying the degree of white spot lesions on enamel caused by different commercial beverages using the Canary Caries Detection System: An in vitro study’, *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 16(1), pp. 29–34. Available at: <https://doi.org/10.34172/joddd.2022.005>.
- Mitsiadis, T.A. and Orsini, G. (2016) ‘Editorial: A New Era in Dentistry: Stem Cell-Based Approaches for Tooth and Periodontal Tissue Regeneration’, *Frontiers in Physiology*, 7, p. 357. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00357>.
- Moradian-Oldak, J. (2012) ‘Protein-mediated Enamel Mineralization’, *Frontiers in Bioscience*, 17(7), p. 1996. Available at: <https://doi.org/10.2741/4034>.
- Movasaghi, Z., Rehman, S. and ur Rehman, Dr.I. (2008) ‘Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues’, *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), pp. 134–179. Available at: <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>.

- Moynihan, P. and Petersen, P.E. (2004) 'Diet, nutrition and the prevention of dental diseases', *Public Health Nutrition*, 7(1a), pp. 201–226. Available at: <https://doi.org/10.1079/PHN2003589>.
- Nadar, B.G. *et al.* (2022) 'Efficacy of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate varnish in remineralizing white spot lesions: A systematic review and meta-analysis', *Dental Research Journal*, 19, p. 48.
- Najibfard, K. *et al.* (2011) 'Remineralization of early caries by a nano-hydroxyapatite dentifrice', *The Journal of Clinical Dentistry*, 22(5), pp. 139–143.
- Naumova, E.A. *et al.* (2019) 'Bacterial viability in oral biofilm after tooth brushing with amine fluoride or sodium fluoride', *Archives of Oral Biology*, 97, pp. 91–96. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.10.013>.
- Niazi, F.C. and Pepper, T. (2022) 'Dental Fluorosis', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585039/> (Accessed: 28 February 2023).
- Nokhbatolfighahaie, H. *et al.* (2013) 'Evaluation of Accuracy of DIAGNOdent in Diagnosis of Primary and Secondary Caries in Comparison to Conventional Methods', 4(4).
- Notarstefano, V. *et al.* (2020) 'Exploiting fourier transform infrared and Raman microspectroscopies on cancer stem cells from oral squamous cells carcinoma: new evidence of acquired cisplatin chemoresistance', *The Analyst*, 145(24), pp. 8038–8049. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0AN01623C>.
- Opal, S. *et al.* (2015) 'Genetic factors affecting dental caries risk', *Australian Dental Journal*, 60(1), pp. 2–11. Available at: <https://doi.org/10.1111/adj.12262>.
- Orilisi, G. *et al.* (2021) 'ATR-FTIR, EDS and SEM evaluations of enamel structure after treatment with hydrogen peroxide bleaching agents loaded with nano-hydroxyapatite particles', *PeerJ*, 9, p. e10606. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.10606>.
- Orsini, G. *et al.* (2021) 'Vibrational Imaging Techniques for the Characterization of Hard Dental Tissues: From Bench-Top to Chair-Side', *Applied Sciences*, 11(24), p. 11953. Available at: <https://doi.org/10.3390/app112411953>.
- Pandya, M. and Diekwisch, T.G.H. (2019) 'Enamel biomimetics—fiction or future of dentistry', *International Journal of Oral Science*, 11(1), p. 8. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0038-6>.
- Philip, N. (2019) 'State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management', *Caries Research*, 53(3), pp. 284–295. Available at: <https://doi.org/10.1159/000493031>.
- Pitts, N., Ekstrand, K., and The ICDAS Foundation (2013) 'International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries', *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 41(1), pp. e41–e52. Available at: <https://doi.org/10.1111/cdoe.12025>.

- Pretty, I.A. (2006) 'Caries detection and diagnosis: novel technologies', *Journal of Dentistry*, 34(10), pp. 727–739. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2006.06.001>.
- Pretty, I.A. and Ellwood, R.P. (2013) 'The caries continuum: Opportunities to detect, treat and monitor the re-mineralization of early caries lesions', *Journal of Dentistry*, 41, pp. S12–S21. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.04.003>.
- Puleio, F. *et al.* (2022) 'Systematic Review on White Spot Lesions Treatments', *European Journal of Dentistry*, 16(01), pp. 41–48. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731931>.
- Queiroz, C.S. *et al.* (2008) 'pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization', *Brazilian Dental Journal*, 19(1), pp. 21–27. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0103-64402008000100004>.
- Rajendiran, M. *et al.* (2021) 'Recent Development of Active Ingredients in Mouthwashes and Toothpastes for Periodontal Diseases', *Molecules*, 26(7), p. 2001. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26072001>.
- Raman, C.V. and Krishnan, K.S. (1928) 'A New Type of Secondary Radiation', *Nature*, 121(3048), pp. 501–502. Available at: <https://doi.org/10.1038/121501c0>.
- Rathee, M. and Jain, P. (2022) 'Embryology, Teeth', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560515/> (Accessed: 18 March 2023).
- Reddy, P. *et al.* (2019) 'Amelogenesis Imperfecta with Nephrocalcinosis: A Rare Association in Siblings', *Cureus*, 11(7), p. e5060. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.5060>.
- Reema, S.D., Lahiri, P.K. and Roy, S.S. (2014) 'Review of casein phosphopeptides-amorphous calcium phosphate', *The Chinese journal of dental research: the official journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA)*, 17(1), pp. 7–14.
- Reyes-Gasga, J. *et al.* (2013) 'XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite', *Materials Science and Engineering: C*, 33(8), pp. 4568–4574. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.014>.
- Robinson, C. *et al.* (1995) 'The chemistry of enamel development', *The International Journal of Developmental Biology*, 39(1), pp. 145–152.
- Robinson, C. (2014) 'Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias', *Frontiers in Physiology*, 5. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00388>.
- Rodd, H.D. *et al.* (2021) 'Molar Incisor Hypomineralisation: Current Knowledge and Practice', *International Dental Journal*, 71(4), pp. 285–291. Available at: <https://doi.org/10.1111/idj.12624>.
- Rominu, M. *et al.* (2014) 'Zirconia enriched dental adhesive: a solution for OCT contrast enhancement. Demonstrative study by synchrotron radiation microtomography', *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 30(4), pp. 417–423. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.01.004>.

- Saccucci, M. *et al.* (2022) ‘Assessment of Enamel Color Stability of Resins Infiltration Treatment in Human Teeth: A Systematic Review’, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(18), p. 11269. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph191811269>.
- Sadyrin, E. *et al.* (2020) ‘Characterization of Enamel and Dentine about a White Spot Lesion: Mechanical Properties, Mineral Density, Microstructure and Molecular Composition’, *Nanomaterials*, 10(9), p. 1889. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano10091889>.
- Sæthre-Sundli, H.B. *et al.* (2022) ‘Fissure sealing and caries development in Norwegian children’, *European Archives of Paediatric Dentistry*, 23(6), pp. 905–910. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40368-022-00729-3>.
- Satou, R., Yamagishi, A., *et al.* (2022) ‘Improved Enamel Acid Resistance by Highly Concentrated Acidulated Phosphate Sodium Monofluorophosphate Solution’, *Materials*, 15(20), p. 7298. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma15207298>.
- Satou, R., Iwasaki, M., *et al.* (2022) ‘Improved Enamel Acid Resistance Using Biocompatible Nano-Hydroxyapatite Coating Method’, *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(20), p. 7171. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma15207171>.
- Schiffner, U. (2021) ‘Verwendung von Fluoriden zur Kariesprävention’, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 64(7), pp. 830–837. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00103-021-03347-4>.
- Schneider, J.-M., Bigerelle, M. and Iost, A. (1999) ‘Statistical analysis of the Vickers hardness’, *Materials Science and Engineering: A*, 262(1–2), pp. 256–263. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0921-5093\(98\)01000-4](https://doi.org/10.1016/S0921-5093(98)01000-4).
- Schwass, D.R. *et al.* (2009) ‘A System of Calibrating Microtomography for Use in Caries Research’, *Caries Research*, 43(4), pp. 314–321. Available at: <https://doi.org/10.1159/000226230>.
- Scribante, A. *et al.* (2020) ‘Biomimetic Effect of Nano-Hydroxyapatite in Demineralized Enamel before Orthodontic Bonding of Brackets and Attachments: Visual, Adhesion Strength, and Hardness in In Vitro Tests’, *BioMed Research International*, 2020, p. 6747498. Available at: <https://doi.org/10.1155/2020/6747498>.
- Sh, P. *et al.* (2013) ‘Effect of organic versus inorganic fluoride on enamel microhardness: An in vitro study’, *Journal of conservative dentistry: JCD*, 16(3), pp. 203–207. Available at: <https://doi.org/10.4103/0972-0707.111314>.
- Shani, S. (1996) ‘Relation between surface activity and antibacterial activity of amine-fluorides’, *International Journal of Pharmaceutics*, 131(1), pp. 33–39. Available at: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04299-7](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04299-7).
- Shivakumar, K., Prasad, S. and Chandu, G. (2009) ‘International Caries Detection and Assessment System: A new paradigm in detection of dental caries’, *Journal of conservative dentistry: JCD*, 12(1), pp. 10–16. Available at: <https://doi.org/10.4103/0972-0707.53335>.

- Shrestha, D. and Rajbhandari, P. (2018) 'Prevalence and Its Associated Risk Factors in Tooth Wear', *Journal of Nepal Medical Association*, 56(212), pp. 719–723. Available at: <https://doi.org/10.31729/jnma.3644>.
- Smith, C.E.L. *et al.* (2017) 'Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways', *Frontiers in Physiology*, 8, p. 435. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00435>.
- Sridhar, L.P. (2016) 'Comparative Evaluation of the Marginal Sealing Ability of two Commercially Available Pit and Fissure Sealants', *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/19996.8413>.
- Strassler, H.E. and Pitel, M.L. (2014) 'Using fiber-optic transillumination as a diagnostic aid in dental practice', *Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg, N.J.: 1995)*, 35(2), pp. 80–88.
- Strużycka, I. (2014) 'The Oral Microbiome in Dental Caries', *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), pp. 127–135. Available at: <https://doi.org/10.33073/pjm-2014-018>.
- 'Surface-Enhanced Raman Scattering and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering' (2005) in Smith, E. and Dent, G., *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 113–133. Available at: <https://doi.org/10.1002/0470011831.ch5>.
- Tanizawa, Y. *et al.* (1991) 'Reaction characteristics of hydroxyapatite with F⁻ and PO₃F₂⁻ ions. Chemical states of fluorine in hydroxyapatite', *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 87(14), p. 2235. Available at: <https://doi.org/10.1039/ft9918702235>.
- Tinanoff, N. (2019) 'Dental Caries', in *Pediatric Dentistry*. Elsevier, pp. 169–179. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-60826-8.00012-2>.
- Toupenay, S. *et al.* (2018) 'Amelogenesis imperfecta: therapeutic strategy from primary to permanent dentition across case reports', *BMC oral health*, 18(1), p. 108. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0554-y>.
- Tschope, P. *et al.* (2011) 'Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes', *Journal of Dentistry*, 39(6), pp. 430–437. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.03.008>.
- Tsurumachi, T. *et al.* (2015) 'Developmental disturbance of a mandibular central incisor following trauma to the primary predecessor', *Journal of Oral Science*, 57(2), pp. 157–160. Available at: <https://doi.org/10.2334/josnusd.57.157>.
- Tu, S.-J. *et al.* (2019) 'Extraction of gray-scale intensity distributions from micro computed tomography imaging for femoral cortical bone differentiation between low-magnesium and normal diets in a laboratory mouse model', *Scientific Reports*, 9(1), p. 8135. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44610-8>.
- Tufekci, E. *et al.* (2011) 'Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances', *The Angle Orthodontist*, 81(2), pp. 206–210. Available at: <https://doi.org/10.2319/051710-262.1>.

- Verma, P. and Muthuswamy Pandian, S. (2021) ‘Bionic effects of nano hydroxyapatite dentifrice on demineralised surface of enamel post orthodontic debonding: in-vivo split mouth study’, *Progress in Orthodontics*, 22(1), p. 39. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40510-021-00381-5>.
- Vieira, A.R. (2013) ‘Genetics and Caries – Perspectives’.
- Wang, J. *et al.* (2013) ‘Imaging of extraradicular biofilm using combined scanning electron microscopy and stereomicroscopy’, *Microscopy Research and Technique*, 76(9), pp. 979–983. Available at: <https://doi.org/10.1002/jemt.22257>.
- Wegehaupt, F. and Menghini, G. (2020) ‘[Fluoride Update]’, *Swiss Dental Journal*, 130(9), pp. 677–683.
- Wei, Y. *et al.* (2022) ‘Application of a Caries Treatment Difficulty Assessment System in Dental Caries Management’, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21), p. 14069. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph192114069>.
- Wenzel, A. (2004) ‘Bitewing and Digital Bitewing Radiography for Detection of Caries Lesions’, *Journal of Dental Research*, 83(1_suppl), pp. 72–75. Available at: <https://doi.org/10.1177/154405910408301s14>.
- Weyland, M.I., Jost-Brinkmann, P.-G. and Bartzela, T. (2022) ‘Management of white spot lesions induced during orthodontic treatment with multibracket appliance: a national-based survey’, *Clinical Oral Investigations*, 26(7), pp. 4871–4883. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04454-5>.
- White, W.E. (1983) ‘Monofluorophosphate – Its Beginning’, *Caries Research*, 17(1), pp. 2–8. Available at: <https://doi.org/10.1159/000260723>.
- Wierichs, R.J. *et al.* (2022) ‘Efficacy of nano-hydroxyapatite on caries prevention-a systematic review and meta-analysis’, *Clinical Oral Investigations*, 26(4), pp. 3373–3381. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04390-4>.
- Wright, J.T. (2023) ‘Enamel Phenotypes: Genetic and Environmental Determinants’, *Genes*, 14(3), p. 545. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes14030545>.
- Yan, J. *et al.* (2022) ‘Application of Amorphous Calcium Phosphate Agents in the Prevention and Treatment of Enamel Demineralization’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, p. 853436. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.853436>.
- Yin, K. and Paine, M.L. (2017) ‘Bicarbonate Transport During Enamel Maturation’, *Calcified Tissue International*, 101(5), pp. 457–464. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0311-2>.
- Yu, O.Y. *et al.* (2017) ‘A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research’, *Dentistry Journal*, 5(2), p. 20. Available at: <https://doi.org/10.3390/dj5020020>.
- Zabokova-Bilbilova, E. *et al.* (2014) ‘White Spot Lesions: Prevention and Management During the Orthodontic Treatment’, *PRILOZI*, 35(2), pp. 161–168. Available at: <https://doi.org/10.2478/prilozi-2014-0021>.

Zhang, Q. *et al.* (2022) ‘Application of fluoride disturbs plaque microecology and promotes remineralization of enamel initial caries’, *Journal of Oral Microbiology*, 14(1), p. 2105022. Available at: <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2105022>.

Zhao, J. *et al.* (2011) ‘Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry’, *Chemistry Central Journal*, 5, p. 40. Available at: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-40>.

Zhao, L., Blackburn, J. and Brosseau, C.L. (2015) ‘Quantitative Detection of Uric Acid by Electrochemical-Surface Enhanced Raman Spectroscopy Using a Multilayered Au/Ag Substrate’, *Analytical Chemistry*, 87(1), pp. 441–447. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac503967s>.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei innanzitutto ringraziare la Relatrice di questa Tesi di Laurea, Chiar.ma Prof.ssa Giovanna Orsini, il Correlatore Dott. Vincenzo Tosco e le Dott.sse Giulia Orilisi e Flavia Vitiello per la loro disponibilità e per il prezioso aiuto che mi hanno fornito durante la stesura di questo elaborato.

Un sentito grazie va a tutti i professori e i pazienti che ho incontrato in questo percorso e che mi hanno aiutata a crescere, professionalmente e umanamente.

Ringrazio di cuore i miei genitori e mio fratello per avermi supportata in ogni momento, per essermi stati sempre vicino e per aver creduto in me fin dal primo istante.

Un ringraziamento in particolare va ai miei carissimi nonni e ai miei zii, che mi sono sempre stati accanto ad ogni piccola tappa di questo percorso, il loro supporto è stato per me fondamentale.

Un ringraziamento speciale va ai miei colleghi, soprattutto a due persone per me molto importanti, Elisa e la mia spalla destra, Rachele, l'altra metà del gruppo arancione, con la quale ho condiviso tutto di questi brevi ma intensi tre anni, dai momenti più stancanti, in cui ci sembrava di non arrivare mai alla fine, ai momenti più allegri e spensierati. Grazie per esserci sempre.

Grazie anche ai miei amici che mi hanno sempre ascoltata e supportata.

Infine vorrei ringraziare me stessa, per non aver mai mollato, per essere sempre andata avanti. Sono stati tre anni impegnativi ma ci sono state anche tante soddisfazioni, tanti successi ottenuti, tante esperienze che mai avrei pensato di fare e che mi hanno portato fino a qui.

Che sia solo il primo di tanti altri traguardi...