

INDICE

SOMMARIO	4
INTRODUZIONE	5
1. ANATOMIA E FUNZIONE DELLO SMALTO DENTALE.....	7
1.1 Formazione dello smalto	7
1.2 La microstruttura dello smalto.....	9
2.2 Demineralizzazione e Remineralizzazione	12
2. LESIONI INIZIALI DELLO SMALTO	14
2.1 Epidemiologia.....	16
2.3 Eziologia.....	17
2.4 Classificazione	18
2.5 Diagnosi	22
2.5.1 <i>Valutazione del rischio</i>	<i>22</i>
2.5.2 <i>Esame obiettivo</i>	<i>23</i>
2.5.3 <i>Esame radiografico</i>	<i>25</i>
2.5.5 <i>Transilluminazione a fibre ottiche (FOTI)</i>	<i>26</i>
2.5.6 <i>Electronic Caries Monitor (ECM).....</i>	<i>27</i>
3. PREVENZIONE E TRATTAMENTO DELLE LESIONI INIZIALI DELLO SMALTO	28
3.1 Agenti remineralizzanti.....	30
3.1.1 <i>Agenti Fluorati</i>	<i>30</i>
3.1.2 <i>Agenti non fluorati.....</i>	<i>34</i>
4. ANALISI STRUMENTALI PER LA VALUTAZIONE DELLE LESIONI INIZIALI DELLO SMALTO	38
4.1 Microscopia elettronica a Scansione	38
5. PROTOCOLLO SPERIMENTALE	40
5.1 Obiettivo dello studio.....	40
5.2 Materiali e Metodi	40

5.2.1 <i>Preparazione del campione</i>	40
5.2.2 <i>Trattamento del campione</i>	42
5.3 Analisi SEM-EDS	43
5.4 Analisi statistica	44
6. RISULTATI	45
7. DISCUSSIONE	48
8. CONCLUSIONI	51
BIBLIOGRAFIA	52

SOMMARIO

Lo scopo di questa Tesi di Laurea consiste nella valutazione e nel confronto dell'efficacia remineralizzante di quattro agenti ad uso professionale su lesioni iniziali artificiali dello smalto, utilizzando come metodica di analisi la Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) combinata con la Spettroscopia a Dispersione di Energia (EDS). La tesi si struttura in quattro parti. Nella prima parte vengono descritte le caratteristiche strutturali dello smalto oltre al processo che porta alla sua formazione. La seconda parte si concentra sulle lesioni iniziali dello smalto esaminandone la struttura sia a livello macroscopico che microscopico, i fattori che ne determinano la formazione, la classificazione, le tecniche diagnostiche, le strategie preventive e i trattamenti disponibili, con un focus sugli agenti remineralizzanti. La terza parte descrive le tecniche utilizzate per la valutazione della mineralizzazione degli agenti testati. La quarta parte presenta la procedura sperimentale e analizza i risultati ottenuti, con l'obiettivo di trarre conclusioni sui diversi principi attivi testati.

INTRODUZIONE

La carie dentale rappresenta un problema crescente nell'Odontoiatria moderna e la sua gestione clinica dovrebbe concentrarsi non solo sul trattamento, ma anche sulla sua precoce rilevazione e prevenzione. Se la lesione viene rilevata precocemente e gestita in modo adeguato la progressione ne può essere arrestata. La demineralizzazione dei tessuti dentali duri è un processo molto complesso causato dall'azione dei batteri acidogeni presenti nel microambiente orale. Gli attacchi acidi dei batteri cariogeni provocano la dissoluzione della principale componente dello smalto, l'idrossiapatite (HA), in ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} e clinicamente portano al primo stadio della malattia cariosa, denominato lesione a macchia bianca (*white spot lesion*), caratterizzata dalla demineralizzazione dello smalto senza cavitazione. Le lesioni iniziali dello smalto hanno un'eziologia multifattoriale, in cui la suscettibilità dell'ospite gioca un ruolo fondamentale, così come hanno un ruolo sia fattori sistemici che quelli locali, quali la dieta, la qualità e la quantità del flusso salivare, la scarsa igiene orale, la presenza di apparecchi ortodontici fissi. (Ardelean et al. 2024). La saliva è un fattore critico nel determinare il rischio di carie e il processo di remineralizzazione. Essa rappresenta infatti un elemento biologico e protettivo fondamentale nel processo di remineralizzazione dello smalto, grazie alla sua capacità tampone, neutralizzando gli acidi, formando una membrana protettiva sulle superfici dentali, e promuovendo così la remineralizzazione (Alshahrani et al. 2019). La carie dentale è altamente prevenibile e reversibile in fase precoce, e l'arresto della demineralizzazione dello smalto è possibile mediante il controllo della formazione del biofilm, favorendo i fattori protettivi della saliva e utilizzando materiali che promuovano il processo di remineralizzazione. Negli ultimi anni, la ricerca sulle carie si è concentrata sullo sviluppo di metodologie per la gestione non invasiva delle lesioni cariose precoci attraverso l'uso degli agenti remineralizzanti, che contribuiscono alla riparazione dei cristalli di HA, e ricostituendone la porzione mineralizzata (Vitiello et al. 2022) La remineralizzazione delle

lesioni iniziali è considerata uno strumento che potrebbe colmare il divario tra prevenzione e procedure cliniche, pertanto, negli ultimi anni, sono stati fatti molti sforzi per migliorare i protocolli clinici esistenti e introdurre di nuovi. A questo scopo, sono stati sviluppati diversi ed innovativi trattamenti basati su specifici agenti attivi, tra cui fluoro, oligopeptidi, nano-HA, vetro bioattivo, fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio amorfo. (Orilisi et al. 2023)

L'obiettivo di questa Tesi è stato quello di valutare il potenziale remineralizzante di quattro agenti remineralizzanti ad uso professionale, contenenti differenti principi attivi su lesioni iniziali dello smalto, provocate artificialmente. Le analisi sono state condotte attraverso l'utilizzo del Microscopio Elettronico a Scansione combinato con Spettroscopia a Dispersione di Energia.

1. ANATOMIA E FUNZIONE DELLO SMALTO DENTALE

Lo smalto dentale costituisce il rivestimento esterno della corona dentale. È un tessuto altamente mineralizzato, tessuto più duro del corpo umano, presente su tutte le superfici del dente clinicamente visibili nella cavità orale. (Hand 2015)

L'unicità della sua struttura e composizione gli conferisce una notevole resistenza all'usura e alla frattura, agendo così da barriera contro le forze fisiche, termiche, e chimiche, proteggendo i tessuti sottostanti. (Lacruz et al. 2017)

È l'unico tessuto dentale di origine ectodermica, con struttura acellulare, esposto alla calcificazione in assenza di nervi e vasi sanguigni. (Kunin, Evdokimova, e Moiseeva 2015) Lo smalto umano non ha capacità di riparazione poiché le cellule che formano questo tessuto vengono perse durante il processo di eruzione del dente. Il processo di formazione dello smalto è conosciuto con il nome di amelogenesi, ed è un fenomeno complesso che può essere perturbato da una varietà di fattori genetici e ambientali. (Wright 2023)

1.1 Formazione dello smalto

L'amelogenesi è il processo che porta alla formazione dello smalto dentale. (C. E. Smith e Nanci 1995) Lo sviluppo coinvolge quattro fasi distinte: fase pre-secretoria, fase secretoria, fase di transizione, fase di maturazione. (Yin e Paine 2017)

Le cellule responsabili dello sviluppo dello smalto sono gli ameloblasti, cellule epiteliali specializzate che fanno parte dell'organo dello smalto, il quale è costituito da uno strato epiteliale esterno, dal reticolo stellato, da uno strato intermedio e dall'epitelio interno dello smalto (strato degli ameloblasti). Uno dei primi eventi che si verificano, rispettivamente durante

la fase pre-secretoria, è la deposizione di predentina da parte degli odontoblasti presso la futura giunzione amelo-cementizia. La predentina è composta principalmente da collagene ed è la prima a mineralizzarsi, a ridosso di quella che diventerà la giunzione amelo-cementizia. Quasi immediatamente dopo l'inizio della mineralizzazione della dentina, i preameloblasti in differenziazione estendono proiezioni citoplasmatiche attraverso la membrana basale, che verrà poi rimossa e distrutta. Successivamente, nella fase secretoria, i preameloblasti si trasformano in ameloblasti, cellule di forma colonnare costituite dai processi di Tomes, i quali rappresentano una struttura conica che punta verso la matrice di smalto formante. Durante questa fase, gli ameloblasti cominciano a secernere grandi quantità di proteine strutturali quali amelogenina (AMELX), ameloblastina (AMBN), enamina (ENAM) e due proteasi (la metalloproteasi-20 e la kallikreina-4 KLK4). L'amelogenina costituisce circa l'80-90% della materia organica all'interno della matrice dello smalto in fase secretoria, mentre l'ameloblastina e l'enamina rappresentano circa il 5% e il 3-5%. (Bartlett 2013).

Inoltre, iniziano a formarsi i precursori dei cristalli di HA, perpendicolarmente alla giunzione dentino-smalto (DEJ), influenzati dalle proteine della matrice. Questi cristalli crescono lungo il loro asse mentre gli ameloblasti si allontanano dalla dentina. Lo smalto, in questa fase, appare morbido e simile a un gel, composto soprattutto da proteine e acqua. Verso la fine della fase secretoria, prima della maturazione, gli ameloblasti subiscono cambiamenti morfologici perdono il processo di Tomes. Durante la fase di maturazione, gli ameloblasti diventano più corti rispetto alla fase precedente e alternano ciclicamente due morfologie: quella a "ruffle-ended appearance" (RA) ossia un ameloblasto con bordo ondulato ed a "smooth-ended appearance" (SA), ossia un ameloblasto con bordo liscio, organizzandosi in gruppi coordinati lungo la circonferenza della corona. Le cellule RA sono deputate al trasporto degli ioni dentro e fuori l'organo dello smalto e alla rimozione dei frammenti di matrice proteica dello smalto. Al contrario, le cellule SA facilitano il movimento di fluidi intercellulari che

contribuiscono a neutralizzare il pH della matrice dello smalto. (Lacruz et al. 2017)

Queste due morfologie riflettono le funzioni cicliche degli ameloblasti, necessarie per regolare il pH e controllare il trasporto di ioni, permettendo allo smalto di diventare progressivamente più mineralizzato, fino a riempire il volume del tessuto con cristalliti. (C. E. L. Smith et al. 2017)

Durante questa fase, la matrice dello smalto, inizialmente parzialmente mineralizzata, diventa completamente mineralizzata grazie alla degradazione e rimozione delle proteine residue della matrice, tramite l'azione della proteasi KLK4, mentre i cristalliti dello smalto crescono in larghezza e spessore. (Crawford, Aldred, e Bloch-Zupan 2007)

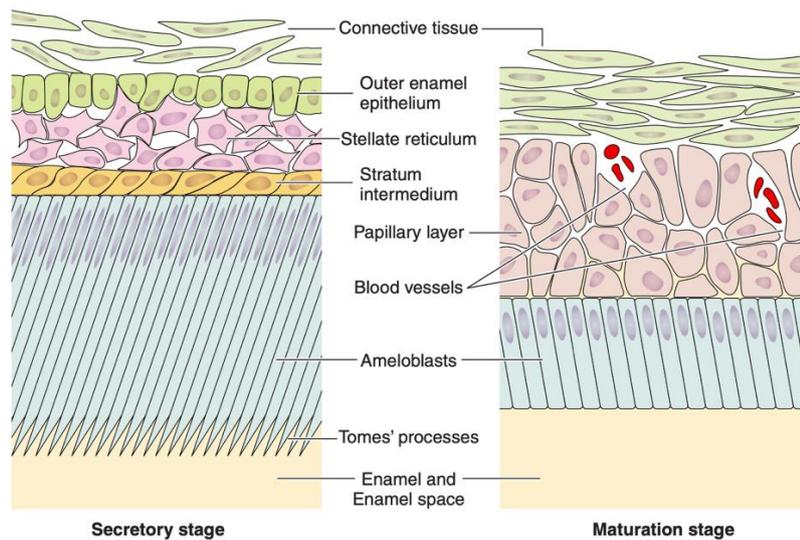


Figura 1 – Stadio di secrezione e di maturazione dell'amelogenesi (Lacruz et al., 2017)

1.2 La microstruttura dello smalto

Lo smalto dentale è composto per il 96% in peso da materiali inorganici, dal 3% di acqua e 1% di proteine. (Shahmoradi et al. 2014)

La chiave per ottenere la caratteristica architettura organizzata dello smalto risiede non solo nel movimento coordinato e nelle precise attività secretorie degli ameloblasti, ma anche nel modo in cui i componenti della matrice extracellulare, come proteine ed enzimi, interagiscono tra loro, con gli ioni mineralizzanti, le cellule e l'HA in formazione (*Figura 3*) (J. Moradian-Oldak e George 2021).

La componente inorganica è costituita da cristalli di HA che lo rende un tessuto duro, acellulare e avascolare. (Farooq e Bugshan 2021).

I cristalli dello smalto si differenziano rispetto agli altri tessuti duri per le loro dimensioni maggiori; presentano una larghezza di 60-70 nm, uno spessore di 25-30 nm e si allungano progressivamente durante il processo di mineralizzazione. La dimensione, l'orientamento, la distribuzione e i modelli di impaccamento dei cristalli sono controllati dai geni e presentano una limitata variabilità intraspecifica.

La maggior parte di essi ha una forma a bastoncino, ma ci sono anche cristalli a forma di ago, cubo, rettangolo, rombo e altre forme. (Kunin, Evdokimova, e Moiseeva 2015)

Ogni cristallo si dispone in una struttura esagonale a formare una struttura più grande: i prismi dello smalto. Quest'ultimi, rappresentano le unità strutturali primarie e fondamentali dello smalto dei denti. Consistono in strutture cilindriche che corrono ininterrottamente attraverso lo spessore dello smalto, dalla giunzione dentino-smalto (DEJ) fino alla superficie esterna dello smalto (Shahmoradi et al. 2014). In sezione trasversale, i prismi dello smalto assomigliano a una struttura a buco di serratura, con la testa rivolta verso la superficie del dente e la coda posizionata in direzione cervicale, permettendo così un imballaggio compatto dei prismi dello smalto (*Figura 2*). La dimensione del prisma dello smalto è di circa 3-6 μm di diametro e 9 μm di altezza; ogni prisma contiene circa 1000 cristalli di HA che si estendono dalla giunzione dentina-smalto (DEJ) fino alla superficie. (Disha et al. 2024)

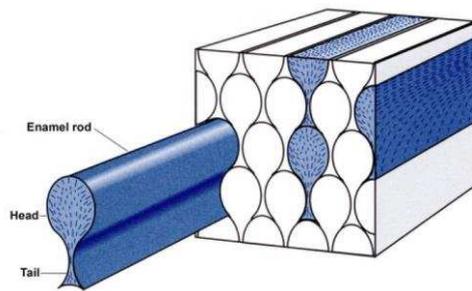


Figura 2 - Schema della sezione trasversale dello smalto che mostra i prismi dello smalto con le regioni della testa e della coda. (Habelitz 2015)

La composizione ideale dell'HA corrisponde alla formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, dove il rapporto calcio su fosforo (Ca/P) è 1,67. Tuttavia, diversi studi hanno rimarcato l'eterogeneità della composizione chimica dello smalto tra lo strato interno e quello esterno. I più alti livelli di Ca e P sono stati riscontrati nello strato superficiale dello smalto integro. Diversamente, negli strati centrali, la concentrazione di questi elementi è leggermente inferiore rispetto agli strati superficiali, mentre il livello più basso di Ca e P si è osservato al confine tra smalto e dentina. Inoltre, lo smalto contiene anche altri elementi come Mn, Fe, Ni, Co, Zn, Cu, Pb, Sr e Hg, in cui la loro concentrazione varia a seconda dell'area dentale. (Kunin, Evdokimova, e Moiseeva 2015) D'altra parte la componente organica, sebbene sia la componente minore dello smalto maturo, svolge un ruolo molto importante nel rafforzare meccanicamente questo tessuto. (Duverger, Beniash, e Morasso 2016) Difatti è costituita da diverse proteine strutturali che influenzano le proprietà viscoelastiche dello smalto, conferendogli resistenza e tenacità. (Janet Moradian-Oldak 2012)

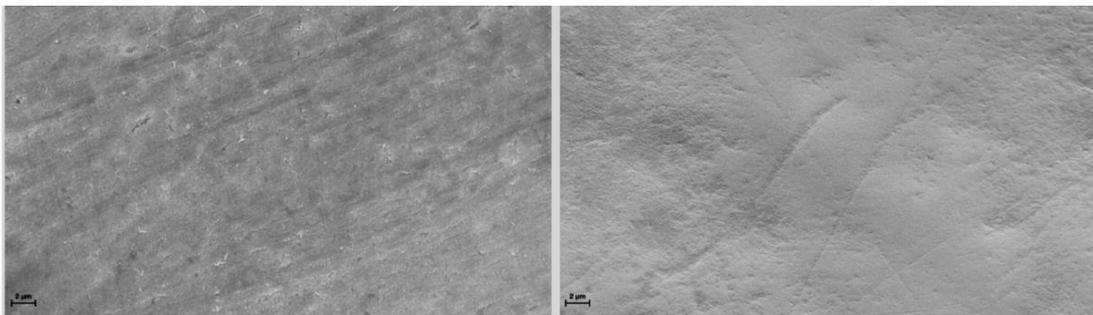


Figura 3 - Micrografie elettroniche a scansione dello smalto sano. Le immagini SEM mostrano

micromorfologia superficiale dello smalto sano con la tipica struttura regolare intatta. (Vitiello et al. 2024)

2.2 Demineralizzazione e Remineralizzazione

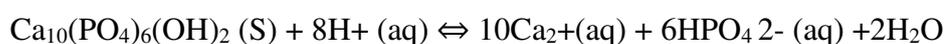
La cavità orale è un ecosistema caratterizzato da un'instabilità delle sue condizioni ecologiche. I tessuti duri dentali sono soggetti a cicli continui di demineralizzazione e remineralizzazione. La demineralizzazione è un processo chimico che porta alla rimozione dei componenti inorganici dello smalto a causa degli acidi prodotti dai batteri presenti nella placca dentale. (Alsubhi et al. 2021)

Un calo del pH nella cavità orale provoca la demineralizzazione, che, se prolungata, porta alla perdita di minerali dalla struttura del dente, risultando nella formazione della carie dentale. (Chikkanarasaiah, Siddaiah, e Preethi 2019)

Nella cavità orale si verificano diminuzioni del pH dopo ogni pasto, il che comporta una crescente acidificazione dell'ambiente della placca e, di conseguenza, cambia la composizione della flora batterica. Questo porta ad una moltiplicazione selettiva nel biofilm dentale di batteri noti come *Streptococchi non mutans a basso pH*, che sono più acidogenici e acidofili rispetto ai ceppi non mutans originali, il che sposta ulteriormente l'equilibrio dei processi di de- e remineralizzazione verso la demineralizzazione, portando a un aumento dello sviluppo di *S. mutans* e *Lactobacillus* e alla progressione del processo carioso.

La saliva umana, invece, fornisce una protezione contro il processo di demineralizzazione, grazie alla capacità tampone e agendo come vettore di ioni essenziali che possono apportare un cambiamento costruttivo nella struttura dello smalto, promuovendo la remineralizzazione. (Farooq e Bugshan 2021)

Il pH critico dello smalto è 5,5, durante il quale la saliva e i fluidi del biofilm presentano uno stato di saturazione con ioni calcio e fosfato, causando una perdita netta di smalto. La dissoluzione acida della componente di HA dei tessuti duri dentali avviene come descritto nella seguente equazione (*Figura 4*):



Il processo di dissoluzione si manifesta come una sequenza "dall'alto verso il basso" con la perdita di densità minerale sulla superficie rispetto alle zone interne. Un'esposizione cronica all'ambiente acido porta a una perdita irreversibile su larga scala del tessuto superficiale. Dal punto di vista ultrastrutturale, è stato dimostrato che l'inizio della lesione si verifica nella guaina dei prismi dello smalto, seguita dalla perdita del nucleo e della regione interprismatica. Il pattern di dissoluzione avviene in una direzione centripeta, con una perdita maggiore sulla superficie rispetto alle regioni interne. La reversibilità della perdita ionica è possibile nelle fasi iniziali; tuttavia, spesso non viene rilevata a causa dell'assenza di lesioni clinicamente visibili. Lo smalto deciduo è più suscettibile alla demineralizzazione acida rispetto allo smalto permanente a causa della diversa orientazione cristallina dell'HA. (Ramya, Rajashree, e Balakumar 2021) La superficie dello smalto dei denti è pertanto sottoposta costantemente ad un sistema di equilibrio dinamico, in cui, a seconda dei fattori influenzanti, può verificarsi uno squilibrio che porta verso la demineralizzazione o, al contrario, verso la remineralizzazione. Da questo complesso meccanismo derivano le lesioni iniziali cariose, le quali si caratterizzano per la presenza di una zona superficiale intatta, con uno spessore che si aggira intorno ai 40µm.

La progressione o l'arresto delle lesioni dipendono dall'equilibrio tra i fattori patologici che favoriscono la demineralizzazione (batteri cariogeni, carboidrati fermentabili, disfunzione salivare) e i fattori protettivi (agenti antibatterici, saliva sufficiente, ioni remineralizzanti) che inclinano l'equilibrio verso la remineralizzazione. (Philip 2019)

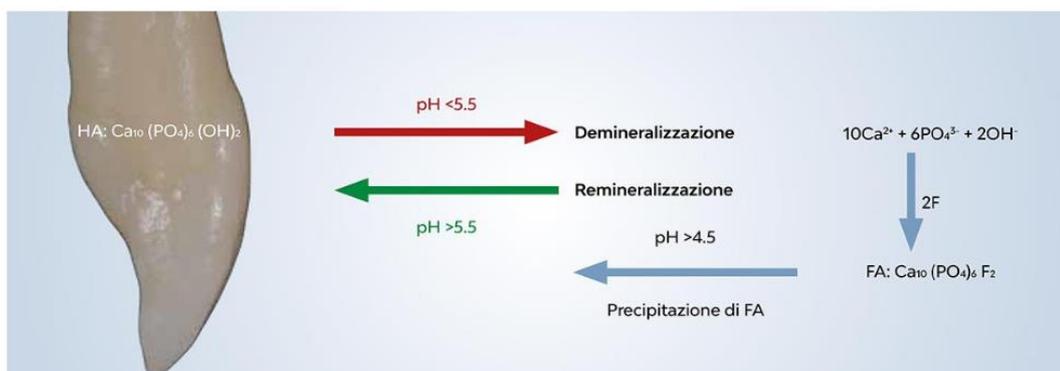


Figura 4- Meccanismi di demineralizzazione e remineralizzazione. (Emiliani e Turrini 2024)

2. LESIONI INIZIALI DELLO SMALTO

La carie dentale è un processo dinamico che deriva da uno squilibrio tra demineralizzazione e remineralizzazione della superficie dentale. Le lesioni cariose iniziali rappresentano la fase più precoce della carie dentale o demineralizzazione e possono essere arrestate o progredire fino alla cavitazione. La lesione iniziale dello smalto appare clinicamente come una macchia bianca che prende il nome di *white spot lesion* (WSL). (Machale, Shetiya, e Agarwal 2013) Il termine "lesione a macchia bianca" è stato definito da Fejerskov et al. come "il primo segno di lesione cariosa sullo smalto che può essere rilevato a occhio nudo". (Ardelean et al. 2024) Essa consiste in un'area demineralizzata dello smalto, priva di cavitazione con aspetto gessoso a causa un fenomeno ottico dovuto alla perdita di minerali nello strato subsuperficiale (*Figura 4*). La translucenza dello smalto è una caratteristica legata alla composizione dello spazio intercristallino ed è definita dall'indice di rifrazione dello smalto.

Lo strato superficiale delle WSL ha uno spessore medio di 40–45 µm e un contenuto minerale dell'82–84%. (Vitiello et al. 2024)

L'aspetto delle WSLs può essere variabile. Una delle caratteristiche principali è l'aspetto, il colore lattescente opaco, con una superficie ruvida apprezzabile al passaggio delicato di una sonda explorer. Spesso vengono associate anche a uno stato di infiammazione dei tessuti gengivali prossimi alla lesione, soprattutto quando si localizzano lungo il margine cervicale delle corone degli elementi dentari. La presenza di queste caratteristiche tattili e visive ci permette di definire questo gruppo di WSL come lesioni attive, ovvero porzioni di smalto che sono soggette a fenomeni di perdita di sostanza minerale. Quando invece le WSL si manifestano sempre di colore bianco, ma l'aspetto dello smalto non è ruvido, ma si presenta liscio, brillante, con un buono stato di salute dei tessuti gengivali, le definiamo lesioni non attive. (Emiliani e Turrini 2024)

Clinicamente, pertanto, l'aspetto della lesione è di un bianco opaco, a causa del fenomeno ottico causato dalla perdita di minerali e dalla differenza

nell'indice di rifrazione dell'acqua e dell'aria che riempiono gli spazi formati nello smalto. In questo modo, la lesione apparirà con poca trasparenza poiché c'è un aumento della porosità dello smalto. Questa irregolarità superficiale provoca quindi una perdita di brillantezza, rendendo la riflessione della luce diffusa. (Khatri et al. 2022) Istologicamente, la lesione iniziale dello smalto viene descritta in quattro zone distinte, riconosciute mediante microscopia a luce polarizzata secondo la birifrangenza. Queste zone sono visibili come appaiono dalla superficie dello smalto verso la giunzione smalto-dentina. La prima è la zona di superficie, uno strato intatto con uno spessore di 35-130 μm . Si ritiene che la zona di superficie rimanga intatta grazie alla presenza e alla deposizione di ioni come Ca^{2+} e PO_4^{3-} dalla saliva. La seconda zona, il corpo della lesione, mostra una considerevole perdita di minerali, circa il 24%, e presenta cambiamenti nella morfologia dei cristalliti. La terza zona, la zona scura, mostra un ingrandimento dei pori e una perdita minerale del 6%. La quarta e ultima zona è la zona translucida, la più profonda e considerata la zona di avanzamento della lesione cariosa (*Figura 5*). È caratterizzata dalla perdita di proteine seguita dalla rimozione di sostanze inorganiche. Si è dimostrato che circa l'1-2% della perdita minerale deriva dalla regione interprismatica e dalla periferia del prisma a causa della facilità di flusso di ioni e acidi in queste aree. (Besnard et al. 2023)



Figura 5 - Aspetto clinico iniziale della lesione da macchia bianca su canino superiore vestibolare. (Andrade et al. 2019)

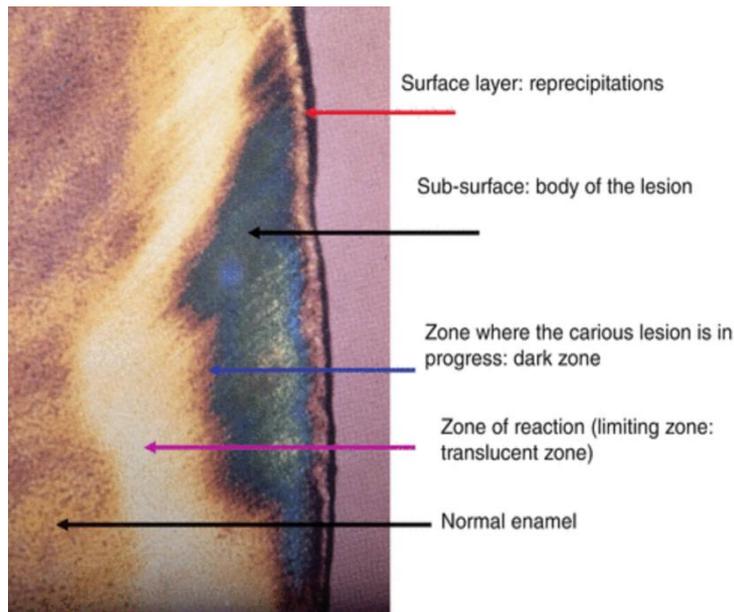


Figura 6 - Schema della lesione cariosa iniziale, che include una zona superficiale, la lesione sottosuperficiale (o corpo della lesione), una zona scura e una zona traslucida. («The Early Enamel Carious Lesion | Pocket Dentistry», s.d.)

2.1 Epidemiologia

La patologia cariosa colpisce miliardi di individui in tutto il mondo, con un enorme impatto negativo sull'economia globale. (Meyer et al. 2024)

Le WSLs sono le più principali responsabili delle aree di scolorimento, con una prevalenza stimata del 24%. Questa prevalenza sale al 49,6% dopo un trattamento ortodontico con apparecchi multibracket con un'incidenza di almeno una lesione non cavitata prima/dopo il trattamento ortodontico del 72,9%.

In un altro studio, è stato osservato che la maggiore prevalenza di WSL era nei denti canini (48,1%), seguiti dagli incisivi laterali (32,3%), dagli incisivi centrali e dai primi premolari (31,6%). Una presenza minore è stata riscontrata nei secondi premolari (27,2%), seguiti dai molari, che hanno riportato una bassa prevalenza dell'8,9%.

Diversi studi hanno dimostrato che i pazienti adolescenti sono più inclini a sviluppare macchie bianche rispetto ai pazienti adulti a causa di scarsa igiene orale, trattamenti ortodontici e dieta ricca di zuccheri. (Marya et al. 2022)

2.3 Eziologia

L'insorgenza di lesioni iniziali sulla superficie dello smalto è dovuta ad un processo dinamico multifattoriale. (Srivastava et al. 2013)

Le WSLs possono verificarsi su qualsiasi superficie dentale nella cavità orale in cui il biofilm microbico può svilupparsi e rimanere per un certo periodo di tempo. Inoltre, ad influenzare il loro sviluppo ci sono i fattori che includono, la dieta, i livelli di calcio, fosfato e bicarbonato nella saliva, scarsa igiene orale e la suscettibilità genetica. (Guzmán-Armstrong, Chalmers, e Warren 2010) Difatti, una dieta ricca di carboidrati raffinati, guidano la selezione di batteri con un fenotipo acido-tollerante/produttivo, aumentando così il rischio di carie. (Ardelean et al. 2024) La carie dentale è causata dall'interazione di batteri cariogeni, principalmente lo *Streptococco Mutans*, che metabolizzano i carboidrati fermentabili presenti nella dieta, in particolare il saccarosio. Come risultato di questo processo, vengono prodotti acidi organici, che causano una diminuzione del pH che scende al di sotto di 5,5, determinando così la demineralizzazione dello smalto. Lo smalto viene demineralizzato ogni volta che si consuma zucchero; pertanto, la quantità e la frequenza di zucchero influisce sulla gravità del processo di demineralizzazione. (Meyer et al. 2021)

L'igiene orale rappresenta un fattore importante che influisce sulla salute orale, soprattutto nei pazienti sottoposti a trattamento ortodontico, poiché gli apparecchi fissi creano spazi di ritenzione aggiuntivi e rendono difficile la pulizia dei denti. (Kozak, Sękowska, e Chałas 2020)

Le pratiche di igiene orale mirano ad eliminare il biofilm dentale, la cui attività metabolica può portare al processo di demineralizzazione dello smalto. (Srivastava et al. 2013)

Per quanto concerne i fattori relativi all'ospite, consideriamo il flusso salivare, le caratteristiche anatomiche e strutturali dei tessuti duri e molli.

La saliva svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento della salute orale, eseguendo diverse funzioni come la lubrificazione, l'attività antimicrobica, il mantenimento dell'omeostasi e il controllo del processo di

demineralizzazione e remineralizzazione. La qualità della saliva è generalmente definita dal contenuto proteico, dalla viscosità, dal pH e dalla capacità tampone, mentre le proprietà quantitative della saliva sono legate al suo tasso di flusso. Ridotti tassi di flusso salivare, pH acido e la presenza di elettroliti come fluoruri e calcio nella cavità orale sono stati associati alla carioattività.(Alshahrani et al. 2019)

2.4 Classificazione

Il Sistema Internazionale di Rilevamento e Valutazione delle Carie (ICDAS) è stato sviluppato nel 2002 da un gruppo di ricercatori provenienti da vari istituti dentali in Europa e America con l'obiettivo di standardizzare il rilevamento delle carie. L'ICDAS è un sistema semplice, logico e basato su evidenze scientifiche per la rilevazione e classificazione delle carie, nella pratica clinica, nella ricerca dentale e nella salute pubblica dentale. La versione modificata, ICDAS-II, è stata presentata nel 2005 ed è ora più ampiamente accettata per la codifica della gravità delle carie. (Telang et al. 2021) Questo sistema è stato progettato per identificare il processo carioso in sei stadi, a partire dai primi cambiamenti nello smalto dentale fino alla cavità più estesa causata dalla demineralizzazione. L'ICDAS rileva e valuta le carie in base al fatto che la lesione sia cavitata o non cavitata, alla topografia del dente che include superfici lisce, solchi e fori ciechi, all'anatomia del dente e alla presenza di sigillature. Il sistema comprende un protocollo di esame che prevede l'analisi di una superficie pulita e asciutta di interesse. L'obiettivo dell'implementazione dell'ICDAS è ottenere informazioni di qualità migliore per prendere decisioni riguardanti la diagnosi, la prognosi e la gestione clinica delle carie dentali sia a livello individuale che della salute pubblica. Così, l'ICDAS può fornire un modulo di lavoro che consente la gestione delle carie necessaria per ottenere risultati salutari a lungo termine.(Emiliani e Turrini 2024)

L'ICDAS classifica lo stato delle carie in 6 codici (*Figura 7*):

- **Codice 0:** dente sano, senza segni di demineralizzazione cariosa dopo un tempo di asciugatura con aria di 5 secondi. Le superfici dentali che presentano difetti dentali come l'amelogenesi imperfetta, fluorosi, macchie (estrinseche e intrinseche) o usura dentale come erosione, attrito e abrasione devono essere considerate superfici sane. Anche le superfici dentali con macchie nei solchi che sono associate a abitudini non cariose, come il bere caffè o tè frequente, devono essere considerate come superfici sane.
- **Codice 1:** Questo codice viene assegnato alla superficie dentale quando non si osservano segni di demineralizzazione cariosa o cambiamento di colore quando la superficie è asciutta. Tuttavia, dopo un prolungato tempo di asciugatura di circa 5 secondi, è evidente un'opacità o un cambiamento di colore, sia verso un bianco che verso una leggera macchia marrone sulla superficie dentale.
- **Codice 2:** Quando la superficie dentale è bagnata e l'opacità cariosa con cambiamento di colore (lesione a macchia bianca) è visibile senza asciugatura. Oppure la decolorazione marrone delle fessure e dei solchi appare più ampia delle caratteristiche macchie naturali delle fessure.
- **Codice 3:** Senza asciugatura, è evidente un'opacità cariosa o un cambiamento di colore marrone, con caratteristiche di solchi o fosse più ampi rispetto all'aspetto clinico sano. Una volta applicata l'asciugatura prolungata, si può osservare una perdita della struttura dello smalto all'interno o ai margini delle fessure. È evidente una rottura localizzata della struttura dello smalto senza dentina visibile nella cavità cariosa. Per confermare i risultati visivi, uno specillo a punta arrotondata può essere passato delicatamente sulle fessure e sulle fessure per confermare la valutazione iniziale.

- **Codice 4:** La lesione mostra una superficie di smalto intatta o una cavità o rottura localizzata allo smalto, ma con un'ombra di dentina decolorata sottostante. Il colore dell'ombra intrinseca può apparire marrone, blu e grigio, visibile attraverso la superficie di smalto intatta. Questa ombra può essere rilevata senza asciugatura quando il dente è bagnato. L'esaminatore deve valutare l'origine dell'ombra, se la lesione cariosa è iniziata dalla superficie dentale esaminata o da una superficie adiacente senza evidenza di carie sulla superficie di interesse. Se si conferma che la carie origina dalla superficie dentale adiacente ma l'ombra si riflette sulla superficie testata, allora dovrebbe essere classificata con il codice 0 come superficie sana.
- **Codice 5:** Questo codice viene assegnato alla lesione quando viene rilevata una cavità distinta sullo smalto dentale con dentina visibile sotto la cavitazione dello smalto. Quando la superficie viene esaminata bagnata, la dentina scura apparirà attraverso lo smalto dentale. Ma quando viene applicata l'aria per 5 secondi, si rileverà una cavità franca con evidenza di demineralizzazione cariosa dello smalto, che può apparire come opaca o di colore marrone scuro sulle pareti della cavità, soprattutto nei solchi. Per confermare la valutazione della superficie, l'esaminatore può utilizzare uno specchio a punta arrotondata e farlo scorrere delicatamente lungo la cavità. Se la palla entra nella cavità raggiungendo la dentina, allora la superficie dovrebbe essere registrata come codice 5.
- **Codice 6:** La cavità presenta una perdita profonda ed estesa di struttura dentale, con dentina evidentemente visibile alla parete e alla base della cavità. La cavità può estendersi a coinvolgere metà della superficie dentale con un'aumentata probabilità di raggiungere la polpa dentale.

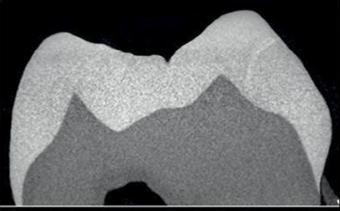
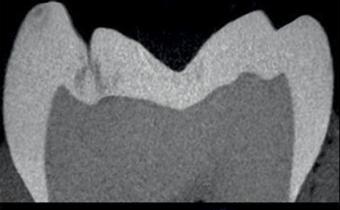
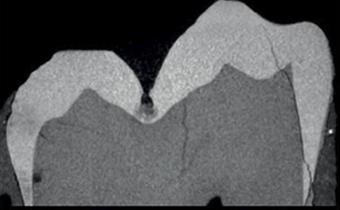
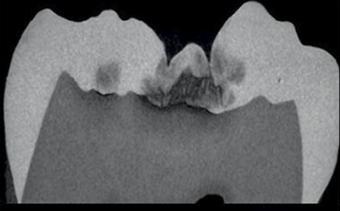
ICDAS	Score	Representative Micro-CT slice	Score
	0		E0
	1		E1
	2		E2
	3		D1
	4		D2

Figura 7 - Campioni rappresentativi che mostrano i punteggi ICDAS e la corrispondente sezione micro-CT della lesione rappresentata nell'immagine di sinistra. (Carvalho et al. 2018)

2.5 Diagnosi

La diagnosi precoce delle lesioni cariose è importante perché il processo carioso può essere modificato attraverso un trattamento preventivo, in modo che la lesione non progredisca. Se la carie viene diagnosticata in una fase iniziale, è possibile favorire l'arresto del processo modificando la dieta, migliorando il controllo della placca e utilizzando adeguatamente sostanze che promuovano il processo di remineralizzazione. Utilizzando metodi diagnostici non invasivi, dovrebbe essere possibile rilevare le lesioni in una fase iniziale e monitorare successivamente i cambiamenti delle lesioni nel tempo, durante il quale si potrebbero introdurre misure preventive. (Diniz, Rodrigues, e Lussi 2012)

Tradizionalmente, i metodi diagnostici “gold standard” per rilevare le lesioni a macchia bianca sono basati su esami visivi e fotografici per valutare la profondità e l'estensione di queste lesioni. Tuttavia, negli ultimi anni sono emerse nuove tecniche diagnostiche, tra cui metodi basati sulla fluorescenza, come il DIAGNOdent, l'Electronic Caries Monitor (ECM) e il FOTI. Queste tecniche avanzate offrono una maggiore precisione nella valutazione delle lesioni cariose. L'obiettivo principale è quello di ottenere una diagnosi più accurata comprendendo la profondità e l'estensione della lesione. Questa precisione consente di adattare i trattamenti in modo specifico a ciascuna lesione, mirando a migliorare i risultati e la prognosi. (Lopes et al. 2024)

2.5.1 Valutazione del rischio

La valutazione del rischio di carie per ogni singolo paziente è fondamentale per la gestione della carie dentale. Il Caries Risk Assessment (CRA) ha come obiettivo principale l'identificazione di individui con un aumento del rischio di insorgenza o progressione della carie nel corso di un periodo di follow-up specifico. Esso prevede la rilevazione delle carie in fase iniziale e consente di adattare la gestione della carie (CRM) ai livelli di rischio individuali. Pertanto, il CRA guida gli operatori nel prendere decisioni riguardanti le procedure diagnostiche, il trattamento e le visite di controllo. È considerato

un pilastro fondamentale nella CRM incentrata sul paziente. (Emiliani e Turrini 2024)

Sono stati sviluppati diversi modelli di CRA tra cui la valutazione del rischio di carie dell'American Dental Association (ADA), la gestione della carie mediante valutazione del rischio (sistema CAMBRA) e il Cariogram.

La valutazione del rischio di carie dell'ADA è il sistema più comunemente usato nei bambini, infatti, è costituito da due classificazioni distinte per fasce di età: una classificazione per le fasce di età tra 0 e 6 anni e l'altro per oltre 6 anni di età. Ognuna delle classificazioni contiene osservazioni cliniche, fattori di prevenzione e fattori di rischio disposti in tre colonne che permettono di attestare un basso, moderato e alto rischio. (Featherstone et al. 2021)

Il *CAMBRA* è un approccio basato su evidenze scientifiche che si concentra sulla determinazione di fattori di rischio che causano l'espressione della malattia e sull'adozione di misure correttive. I clinici possono accertare quali comportamenti aumentano il rischio di malattia e la progressione della malattia valutando il rischio carioso attuale di un paziente. Con questo moderno protocollo CAMBRA, può essere progettato un piano di trattamento innovativo per arrestare il processo carioso, riducendo così la possibilità di progressione e cavitazione. (Maheswari et al. 2015)

Il *Cariogram* è un programma interattivo per il CRA che mostra graficamente, attraverso un grafico a torta, il rischio complessivo del paziente basandosi su numerose osservazioni cliniche, fattori preventivi e fattori di rischio che vengono inseriti nel programma. (Petsi et al. 2014)

2.5.2 Esame obiettivo

L'esame visivo è un metodo ampiamente utilizzato per rilevare lesioni cariose su tutte le superfici. Questo metodo si basa sull'uso di uno specchietto dentale, una sonda affilata e una siringa aria/acqua, e richiede una buona illuminazione e una superficie dentale pulita/asciutta. L'esame si basa principalmente su un'interpretazione soggettiva delle caratteristiche della superficie, come integrità, consistenza, trasparenza/opacità, posizione e colore. Attraverso un

accurato esame clinico di una superficie di smalto pulita e asciutta, è possibile osservare la presenza di queste lesioni nei solchi occlusali, sulla superficie vestibolare e persino sulle superfici prossimali; inoltre, attraverso l'utilizzo delle coloranti rilevatori di placca è possibile calcolare l'indice Full-Mouth Plaque Score per valutare la quantità e la localizzazione di placca e tartaro. (Mortensen et al. 2014)

La prima valutazione consiste pertanto, nello stabilire la presenza di una lesione cariosa primaria nello smalto, la sua estensione e profondità attraverso l'utilizzo di uno specillo con punta arrotondata, come quello di una sonda tipo explorer e utilizzarlo senza eccessiva forza, in quanto rappresenta comunque uno strumento in grado di aggiungere informazioni utili sulla consistenza e sulla struttura di superficie degli elementi dentari. Se la superficie della lesione è intatta, è importante capire se questa superficie ha una consistenza gessosa o una superficie lucente. Una superficie gessosa indica una lesione attiva per la quale sarà richiesto un trattamento di superficie, senza utilizzo di frese. Una superficie lucente può spesso indicare una lesione che si è già arrestata. Altro aspetto importante è valutare il colore della lesione. Un colore marrone combinato con una superficie lucente indica spesso un arresto della lesione. (Emiliani e Turrini 2024)

Come precedentemente descritto, il sistema di rilevamento delle carie standardizzato basato su evidenze scientifiche ICDAS è in grado di fornire informazioni sulla diagnosi e prognosi della carie, valutando l'attività e le caratteristiche cliniche della lesione (Macey et al. 2018). Nonostante sia un metodo ampiamente utilizzato nella pratica clinica, l'esame obiettivo visivo-tattile rimane un elemento fondamentale che dovrebbe essere associato ad altri metodi di rilevamento della carie, come le radiografie bitewing, soprattutto per la rilevazione precoce delle lesioni cariose sulle superfici interprossimali e per la valutazione della profondità delle lesioni sulle superfici occlusali. (Diniz, Rodrigues, e Lussi 2012)

2.5.3 Esame radiografico

La valutazione radiografica viene eseguita generalmente in seguito all'esame obiettivo. Le radiografie bite-wing sono le più indicate e, se correttamente eseguite, permettono di visualizzare con una sola pellicola, quindi con una ridotta esposizione biologica ai raggi X, tutte le porzioni coronali degli elementi latero-posteriori di un'emiarcata, senza sovrapposizione delle creste marginali, per una più corretta valutazione delle zone interprossimali.

Uno studio clinico ha confrontato la diagnosi visiva con quella tramite bitewing, mostrando che la diagnosi visiva ha rilevato solo il 22,9-32,9% delle carie prossimali, mentre le radiografie ne hanno individuato il 93,1-97,1%. Per le carie occlusali, l'esame visivo ha identificato il 75,9-83,9% dei casi, mentre le radiografie bitewing solo il 33,1-42,6%. (Emiliani e Turrini 2024)

2.5.4 DiagnoDent

Il Diagnodent è un dispositivo a fluorescenza laser, sviluppato in Germania nel 1998, come metodo non invasivo e quantitativo, basato sulla fluorescenza prodotta da laser. Si basa sulla quantificazione della fluorescenza emessa dai componenti organici dei tessuti dentali quando eccitati da un diodo laser a 655 nm (alluminio, gallio, indio e fosforo - AlGaInP) situato nella gamma rossa dello spettro visibile.

La luce emessa raggiunge i tessuti dentali attraverso una punta flessibile. Poiché lo smalto maturo è più trasparente, questa luce passa attraverso il tessuto senza essere deviata. A contatto con lo smalto interessato, questa luce verrà diffratta e dispersa. Essa è in grado di eccitare sia il tessuto dentale duro, provocando autofluorescenza, sia i fluorofori presenti nelle lesioni cariose. Questi fluorofori derivano dai prodotti del metabolismo batterico e sono stati identificati come porfirine. Questo dispositivo ha mostrato buoni risultati nella rilevazione delle carie occlusali; tuttavia, potrebbe non essere utilizzato come unico metodo per prendere decisioni terapeutiche. Per questo motivo, DIAGNOdent o DIAGNOdent pen dovrebbero essere utilizzati come

strumento supplementare sia per l'esame visivo che radiografico. (Diniz, Rodrigues, e Lussi 2012)

2.5.5 Transilluminazione a fibre ottiche (FOTI)

La transilluminazione a fibre ottiche (FOTI) è stata introdotta per migliorare la rivelazione precoce delle superfici cariate, impiegata dai clinici come strumento supplementare durante l'esame clinico. Il dispositivo FOTI è un metodo semplice, veloce ed economico per ottenere immagini transilluminate sfruttando i cambiamenti nella dispersione e assorbimento della luce. Utilizzando fibre ottiche, la luce viene proiettata sulla superficie del dente e si propaga attraverso il tessuto dentale, evidenziando le carie come aree scure o ombre a causa della maggiore dispersione nello smalto demineralizzato. La dentina cariata può apparire arancione, marrone o grigia. (Diniz, Rodrigues, e Lussi 2012) Lo scopo è quello di retro-illuminare con la fonte di luce lo smalto, che verrà attraversato dalla luce stessa, evidenziando, se presenti, le aree ipomineralizzate (*Figura 8*). (Emiliani e Turrini 2024)



Figura 8 - Transilluminazione a fibra ottica (FOTI). (Emiliani e Turrini 2024)

2.5.6 *Electronic Caries Monitor (ECM)*

L'Electronic Caries Monitor (ECM) è un altro metodo proposto per la rilevazione delle carie. La demineralizzazione, in teoria, crea porosità; queste porosità si riempiono di acqua e ioni dalla saliva, causando cambiamenti nella conduttività elettrica. (Gomez 2015). L'ECM è il dispositivo che permette di valutare le lesioni cariose considerando i vari parametri che influenzano le misurazioni elettriche dei denti, come porosità, spessore dei tessuti dentali di smalto e dentina, idratazione dello smalto, temperatura, contenuto ionico dei fluidi dei tessuti dentali e tempo di maturazione del dente nell'ambiente orale. Questo metodo ha mostrato risultati diversi in termini di riproducibilità e validità. Alcuni studi *in vitro* hanno indicato che la presenza di macchie può essere un fattore confondente per le misurazioni ECM. Inoltre, potrebbero essere necessari diversi limiti di cut-off per le lesioni cariose dello smalto e della dentina nei denti macchiati. Pertanto, la sua indicazione nella pratica clinica è ancora incerta. Ulteriori studi *in vivo* sono necessari affinché questa tecnologia possa essere utile nella pratica clinica (Diniz, Rodrigues, e Lussi 2012)

3. PREVENZIONE E TRATTAMENTO DELLE LESIONI INIZIALI DELLO SMALTO

La carie dentale è una patologia altamente prevenibile e reversibile nelle fasi iniziali, e l'arresto della lesione può essere ottenuta attraverso l'inibizione della formazione del biofilm.

Negli ultimi anni le strategie preventive, si sono concentrate sullo sviluppo di metodologie non invasive per la gestione delle lesioni cariose iniziali, focalizzandosi sulla remineralizzazione al fine di preservare e ricostituire la struttura dentale.

L'igienista dentale riveste un ruolo fondamentale nella prevenzione della carie. Fornisce cure preventive, educa il paziente a mantenere una corretta igiene orale consigliando la giusta tecnica di spazzolamento per il management del biofilm e inoltre, lo motiva affinché segua una dieta con ridotto consumo di zuccheri quindi a basso indice di cariogenicità. (Khoroushi e Kachuie 2017) Nel caso di pazienti ortodontici, le istruzioni si focalizzano anche su come controllare il biofilm attorno ai brackets dell'apparecchio, in quanto, rappresentano un fattore ritentivo (Heymann e Grauer 2013). Gli spazzolini interdentali rappresentano uno strumento di auto-cura indispensabile per i pazienti sottoposti a trattamento ortodontico, in quanto, hanno dimostrato una maggiore loro efficacia nel ridurre il biofilm, rispetto all'uso dello spazzolino e del filo interdentale (*Figura 9*) (Asquino e Villarnobo 2019). Inoltre, oltre alla rimozione meccanica e al controllo del biofilm, anche l'utilizzo di sigillanti è considerato uno degli elementi fondamentali nella strategia per il controllo della malattia cariosa da parte dell'igienista dentale. L'azione preventiva dei sigillanti è dovuta a un effetto barriera che isola i tessuti dentali dall'ecosistema del cavo orale. Risulta essere infatti un valido strumento per la prevenzione delle carie delle superfici occlusali. (Amodeo et al. 2021) Un'altra tecnica per arrestare le lesioni iniziali dello smalto è quella dell'infiltrazione in resina, che prevede l'utilizzo di acido cloridrico al 15% per aumentare la porosità dello strato superficiale dello smalto seguito dall'applicazione di una resina a bassa viscosità in grado

di infiltrare nelle microporosità dello smalto demineralizzato e stabilizzare la lesione. (Allen et al. 2021)

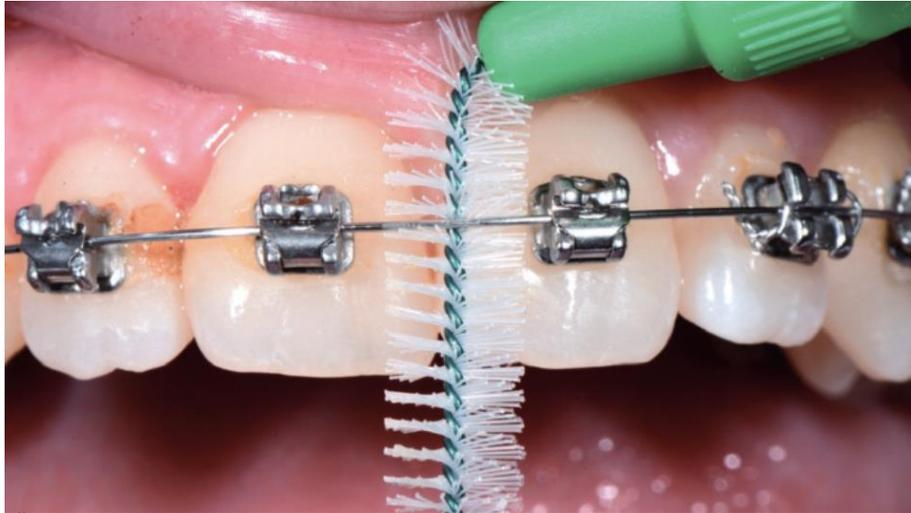


Figura 9 - Utilizzo dello scovolino per la rimozione della placca dai brackets. (Amodeo et al. 2021)

Altresì, l'applicazione topica di agenti remineralizzanti sulla superficie del dente è un elemento fondamentale per prevenire la formazione di lesioni iniziali cariose e arrestarne lo sviluppo. (Yon et al. 2019) Sono disponibili in commercio diversi tipi e concentrazioni di agenti remineralizzanti contenenti fluoro, ioni di calcio e fosfato, i quali remineralizzano lo smalto, formando nuovi cristalli e riparando quelli danneggiati. Tuttavia, sono stati introdotti anche altre molecole diverse dal fluoro, contenenti calcio e fosfato, come il fosfopeptide di caseina- calcio amorfo (CPP-ACP) e l'HA biomimetica, che hanno mostrato risultati promettenti. (Vitiello et al. 2022)

Esistono agenti remineralizzanti ad uso domiciliare e professionale. In quelli domiciliari, gli agenti presenti sono disponibili in basse concentrazioni per l'uso quotidiano e autonomo da parte del paziente; mentre quelli professionali, come gel e vernici, contengono concentrazioni più elevate di agenti e possono essere utilizzati alla poltrona odontoiatrica solo da figure professionali quali odontoiatri e igienisti dentali. (Emiliani e Turrini 2024)

3.1 Agenti remineralizzanti

Gli agenti remineralizzanti utilizzati nel trattamento delle lesioni iniziali dello smalto vengono generalmente classificati in fluorati e non fluorati.

Gli agenti *fluorati* contengono, come principale principio attivo il fluoro, ancora considerato ad oggi il trattamento “gold standard” per le lesioni iniziali dello smalto. Diversamente, gli agenti non fluorati, contengono molecole alternative al fluoro progettate per potenziare e supportare il processo di mineralizzazione. (Hegde, e M, e Shetty 2016)

3.1.1 Agenti Fluorati

Il fluoro ha svolto un ruolo centrale nella prevenzione della carie dentale sin dal 1930 e il suo uso appropriato è considerato una delle scoperte più importanti e uno degli interventi di salute pubblica di maggior successo. (Hayashi et al. 2020)

L'OMS ritiene che la fluoroprofilassi sia una metodica di prevenzione ottimale a tutte le età, senza alcun rischio per l'individuo purché si rispettino dosaggi e somministrazioni. (Amodeo et al. 2021)

Tuttavia, i fluoruri topici applicati professionalmente come gel e vernici, si rivelano più efficaci nella prevenzione delle lesioni cariose, promuovendo la mineralizzazione dello smalto grazie agli ioni calcio e fosfato presenti nella saliva. (Jullien 2021) La funzione del fluoro nella prevenzione della carie è duplice: da un lato agisce rinforzando la struttura dentaria, dall'altro inibendo i microrganismi della placca responsabili della produzione di acidi. Il meccanismo d'azione si esplica con una diminuzione della solubilità dello smalto dovuta alla trasformazione dei cristalli di HA in fluorapatite. La fluorapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), che, rispetto all'HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), è più resistente alla demineralizzazione e alla dissoluzione acida a seguito della produzione di acidi da parte dei batteri, risulta pertanto meno solubile dell'HA più resistente agli attacchi degli acidi degli zuccheri fermentati, promuovendo così la remineralizzazione. (Amodeo et al. 2021)

Inoltre, esercita un ruolo antibatterico, andando ad inibire il metabolismo dei batteri cariogeni: gli ioni fluoruro non possono attraversare la parete batterica, ma a pH basso (quando i batteri producono acidi) entrano nelle cellule batteriche come acido fluoridrico (HF). All'interno, l'HF si dissocia in H^+ e F^- , acidificando l'ambiente e inibendo l'enzima enolasi, riducendo così l'attività metabolica glucidica dei batteri e inibendo la formazione di un biofilm cariogeno. (Emiliani e Turrini 2024)

Il fluoro può essere incorporato con diversi elementi per formare composti che possono essere usati come agenti remineralizzanti come il Na, Sn, Ca, P, ecc. Di seguito, sono descritti i principali composti fluorati combinati con questi elementi, che agiscono come agenti remineralizzanti.

Fluoruro di Sodio

Il fluoruro di sodio (NaF) è un composto di tipo inorganico e viene utilizzato da molto tempo e in larga scala, come agente anticarie (fluorazione acque, dentifrici, collutori). È spesso presente al 2% in soluzione acquosa, e ha un pH prossimo alla neutralità. La maggior parte dei dentifrici commerciali utilizza il fluoro combinato con il sodio, NaF, come agente fluorurato. Tuttavia, a una concentrazione pari a 1.400 ppm, il NaF è in grado di ridurre i polisaccaridi extracellulari prodotti dal biofilm batterico.

Inoltre, ha la capacità di indurre lo scambio tra ioni ossidrili, che compongono l'HA, e gli ioni fluoruro (formazione fluorapatite). (Comar et al. 2012)

Fluoruro stannoso

Il fluoruro stannoso (SnF_2) è un composto di tipo inorganico, il cui nome deriva dal legame tra una molecola di stagno (Sn^{2+}) e una molecola di fluoro (F_2). In ambiente acquoso va incontro ad idrolisi, e la sua dissociazione porta alla liberazione dello stagno. Ha un'elevata affinità con la pellicola che riveste la superficie dentale e con i cristalli di HA. Induce la formazione di un rivestimento stabile e protettivo rispetto agli attacchi acidi sulla superficie

dentale. Gli ioni stagno una volta dissociati dagli ioni fluoruro, hanno proprietà antibatteriche. Queste caratteristiche sono legate sia all'inibizione degli enzimi batterici coinvolti nel trasporto e nel metabolismo del glucosio, che all'inibizione delle metalloproteinasi (MMPs). (Emiliani e Turrini 2024) Inoltre, il SnF₂ ha dimostrato avere una maggiore efficacia rispetto al NaF nella protezione contro l'erosione dentale: forma uno strato protettivo composto da SnF₂, ossido di stagno e fosfato di calcio sulla superficie del dente, che riduce il rischio di usura e ammorbidimento dello smalto causati da acidi non batterici. (Paepegaey et al. 2013)

Sodio monofluorofosfato

Il sodio monofluorofosfato (Na₂PO₃F) è un sale di fluoruro inorganico. Presenta grande stabilità e un'azione prolungata. A concentrazioni inferiori, ha la stessa efficacia del NaF. La sua azione contro i batteri implicati nella carie, lo rende un composto di grande utilizzo. La sua efficacia è legata alla capacità di inibire gli enzimi batterici (ADP-glucosio pirofosforilasi) che catalizzano i polisaccaridi simili al glicogeno determinando un controllo diretto della virulenza batterica. (Emiliani e Turrini 2024)

Fluorofosfato acidulato

Il Fluorofosfato acidulato (APF) è una forma di fluoro comunemente utilizzata in odontoiatria, che grazie l'incorporazione della carbossimetilcellulosa sodica (un polimero solubile in acqua) produce una soluzione viscosa che facilita l'applicazione tramite l'uso di mascherine personalizzate. È costituito inoltre da NaF, acido fosforico e additivi per mantenere un pH basso (tipicamente 3.0–4.0). APF fornisce ioni fluoruro che si incorporano nello smalto dei denti per formare fluorapatite, aumentando così la resistenza dello smalto agli attacchi acidi e prevenendo la demineralizzazione. Inoltre, il pH acido permette una migliore penetrazione del fluoro nello smalto e una maggiore efficacia nella remineralizzazione delle lesioni precoci. (Marinho et al. 2015)

Tuttavia, i gel di APF non dovrebbero essere utilizzati nei pazienti con restauri in resina composita, metallo-ceramica o ceramica in quanto possono causare decolorazione dei restauri. (Shannon e Wescott 1976)

Fluoruro amminico

Il fluoruro amminico (NH_4F) è un composto costituito da uno ione fluoruro legato ad un'ammina organica di acido grasso. La combinazione di una catena di idrocarburo idrofobo (non idrosolubile) con una "testata" idrofila (idrosolubile) è tipica dei tensioattivi che tendono ad accumularsi in modo ordinato sulle superfici e così i fluoruri amminici ricoprono rapidamente e in modo omogeneo la superficie dello smalto. Grazie poi all'azione veicolante esercitata dalle basi amminiche, il fluoro riesce a penetrare ad una profondità di decine di micron.

Gli ioni fluoro reagiscono con l'HA dello smalto formando un precipitato di fluoruro di calcio, meno sensibile agli acidi e più protettivo: una reazione che si può verificare solo in un ambiente moderatamente acido con pH inferiore a 5,7. I NH_4F , infatti, hanno per loro natura un pH leggermente acido che, nel caso dei prodotti a base di fluoruro amminico, varia tra 4,5 e 5,0.

La distribuzione omogenea sulla superficie dello smalto e l'attività di superficie, unite a questo valore di pH, determinano un maggior assorbimento di fluoruro da parte dello smalto e una prolungata permanenza dello stesso con una conseguente cessione di ioni F^- più duratura rispetto alle formulazioni inorganiche. (Emiliani e Turrini 2024)

L'uso quotidiano di prodotti contenenti NH_4F determina quindi un'azione desensibilizzante più efficace e prolungata nel tempo rispetto alla maggior parte degli altri ostruenti chimici utilizzati nei prodotti cosmetici. Pertanto, risulta essere efficace nel trattamento dell'ipersensibilità dentinale e prevenzione della carie. (McFadden e Ames 2023)

3.1.2 Agenti non fluorati

Sebbene il fluoro possa invertire le lesioni iniziali, con azione più efficace sulla superficie della lesione, il che può bloccare i pori dello smalto e ostacolare la remineralizzazione delle aree sottostanti. Ciò, giustifica la ricerca di nuove strategie e materiali innovativi che migliorino, supportino o sostituiscano l'azione del fluoro per ottenere una mineralizzazione dello smalto danneggiato. (Amaechi 2015)

Diverse molecole hanno mostrato risultati promettenti come il fosfopeptide di caseina – fosfato di calcio amorfo (CPP-ACP), la nanoidrossiapatite (nano-HA), i peptidi ecc. Di seguito, vengono descritti i principali composti non fluorati che agiscono come agenti remineralizzanti.

Fosfato di calcio amorfo

Il calcio fosfato amorfo (ACP) è considerato un precursore dell'HA ed è rilevabile nelle prime fasi di formazione di ossa e strutture dentarie, dopo le quali tende a organizzarsi in strutture cristalline dando il via alla formazione dell'HA stessa. L'ACP, quindi, rappresenta uno stadio molto reattivo della cristallogenesi e, grazie alle sue piccole dimensioni, è anche particolarmente indicato per la remineralizzazione delle lesioni di smalto e dentina nell'ambito microstrutturale. Tuttavia, essendo molto reattivo, in presenza di acqua tende a precipitare e a dare luogo alla formazione di cristalli più grossi, meno reattivi e meno idonei a una rigenerazione dello smalto e della dentina. Per questo motivo, l'ACP deve essere contenuto in una sostanza (carrier) che lo isoli dall'acqua e lo mantenga stabile, ma che sia in grado di rilasciarlo velocemente quando raggiunge la superficie dentale. Il carrier più noto in letteratura è un derivato della caseina del latte, e il composto prende il nome di fosfopeptide di caseina (CPP). (Emiliani e Turrini 2024)

Fosfopeptide di caseina - fosfato di calcio amorfo

Il CPP associato all' ACP rappresenta un derivato della caseina del latte, dotata di attività antiplacca e un effetto anticariogeno. Il meccanismo d'azione del CPP-ACP si basa sulla capacità del CPP di mantenere alte concentrazioni di ioni calcio e fosforo e di stabilizzarli sotto forma di ACP per evitare la cristallizzazione spontanea. Inoltre, il nano-complesso CPP-ACP localizza gli ioni di calcio, fosfato e idrossido sulla superficie dentale e mantiene uno stato di supersaturazione nel fluido della placca. Quando il pH scende (≤ 5.8), l'HA inizia a precipitare e a infiltrarsi nel sottostante per ottenere una remineralizzazione efficace dello smalto nell'area della lesione. Inoltre, si è riportato che la combinazione di CPP-ACP e fluoro aumenta l'effetto di remineralizzazione delle lesioni cariose ed erosive. (Singer, Fouda, e Bourauel 2023)

L'assenza di fluoro al suo interno lo rende un prodotto utilizzabile in modo sicuro nei bambini di età inferiore ai 6 anni, ma il suo utilizzo deve essere evitato in pazienti con allergia/intolleranza alle proteine del latte.

Si evidenzia inoltre la sua azione mineralizzante sulle lesioni dello smalto demineralizzato durante il trattamento ortodontico, rendendolo particolarmente efficace nel trattamento di queste tipe di lesioni. (Wang, Yan, e Wang 2012)

Peptidi autoassemblati

I progressi nella ricerca odontoiatrica hanno portato ad un innovativo approccio di remineralizzazione, evidenziando il ruolo dei peptidi oligomerici introdotti come approccio biomimetico alla mineralizzazione per il trattamento e la prevenzione delle lesioni iniziali dello smalto. Un particolare peptide auto-assemblante, il P11⁻⁴, è un peptide sintetico composto da 11 aminoacidi, che in determinate condizioni ambientali si autoassembla in scaffolds fibrillari tridimensionali, simili alla matrice dello smalto. L'assemblaggio del P11⁻⁴ forma strutture simili a impalcature con domini a carica negativa, che rispecchiano le macromolecole biologiche nelle matrici

extracellulari dei tessuti mineralizzati. (Imazato et al. 2023) Pertanto, una volta applicato il peptide auto-assemblante P11⁻⁴ sulla superficie della lesione, i monomeri diffondono all'interno della lesione dove, a causa della maggiore forza ionica e del pH acido della lesione, il P11⁻⁴ si assemblerà e costruirà una struttura a impalcatura tridimensionale all'interno della lesione stessa. (Spinola et al. 2020)

Questa matrice agisce come un'impalcatura per gli ioni di calcio e fosfato provenienti dalla saliva, rendendola capace di creare nuovi cristalli di HA e rigenerare lo smalto perduto. (Dawasaz et al. 2022)

Diversi studi hanno dimostrato che uno dei principali vantaggi dei peptidi auto-assemblanti è la loro capacità di formare una struttura impalcatura biomimetica all'interno delle lesioni cariose sottominate. Questa impalcatura si basa sui processi di mineralizzazione naturale della saliva per promuovere la remineralizzazione e la rigenerazione della lesione. Questo approccio rappresenta pertanto una nuova possibilità di trattare le lesioni cariose nelle loro fasi iniziali utilizzando un trattamento minimamente invasivo e biologicamente focalizzato. (Alkilzy et al. 2023)

Nanoidrossiapatite

La nano-HA è considerata un materiale altamente biocompatibile e bioattivo, con una struttura simile all'apatite dello smalto.

Le particelle di dimensioni nanometriche possono legarsi fortemente alle superfici dello smalto e ai frammenti di placca e batteri. La piccola dimensione delle particelle che compongono la nano-HA aumenta considerevolmente la sua superficie di legame, permettendole infatti di agire come riempitivo per riparare i micropori delle lesioni iniziali dello smalto, fungendo da modello nel processo di remineralizzazione, attirando continuamente grandi quantità di ioni calcio e fosfato dai fluidi orali nella lesione, promuovendo così la crescita dei cristalli di HA. Esperimenti *in vitro* con cicli di pH dinamici hanno dimostrato che la nano-HA ha il potenziale per remineralizzare le lesioni iniziali dello smalto con un'efficacia

paragonabile o addirittura superiore a quella del fluoro. (Philip 2019) La nano-HA rappresenta pertanto una migliore fonte di Ca libero, elemento chiave per quanto riguarda la remineralizzazione, la protezione contro la carie e l'erosione dentale. (Pepla et al. 2014)

S-PRG

La tecnologia del filler in vetro-ionomerico pre-reattivo superficiale (S-PRG) è stata sviluppata da Shofu Inc. ed è l'ingrediente attivo di diversi prodotti che comprendono dentifrici, sigillanti, resine composite e paste da profilassi.

Il filler S-PRG è una particella di vetro fine a tre strati, composta da uno strato esterno di SiO_2 , seguito da una fase di vetro-ionomero pre-reattivo e da un core di vetro di fluoro-boro-alluminio silicato. Date le proprie caratteristiche strutturali, il filler ha la capacità di rilasciare e ricaricare ioni fluoruro permettendo così un rilascio sostenuto di fluoruro, ma anche altri ioni come Sr^{2+} , Na^+ , BO_3^{3-} , Al^{3+} e SiO_3^{2-} ad alte concentrazioni. Questa capacità di rilascio multiplo di ioni conferisce ai materiali resinosi contenenti filler SPRG diversi effetti terapeutici, tra cui la modulazione del pH nel mezzo circostante, creando così condizioni ideali per la remineralizzazione delle lesioni cariose iniziali. (Amaechi 2015)

Gli ioni rilasciati dal filler S-PRG contribuiscono al rafforzamento dello smalto e della dentina, migliorando la loro resistenza agli acidi. È ben noto che gli ioni fluoruro rinforzano il substrato dentale attraverso la formazione di fluorapatite. L'alluminio, invece, forma complessi alluminio-fluorurati, che aiutano a diminuire il processo di demineralizzazione dello smalto e promuovono così la remineralizzazione delle lesioni cariose iniziali. Il borato presenta invece un effetto antibatterico, riducendo così, la formazione di biofilm. La sua presenza come ingrediente principale all'interno delle vernici come trattamento remineralizzante, ha mostrato avere un effetto protettivo superiore rispetto alla vernice al fluoruro di sodio al 5% sulla superficie dello smalto, grazie alla sua particolare composizione che a contatto con l'ambiente orale, determina il rilascio di diversi ioni, senza la degradazione del filler. (Spinola et al. 2020)

4. ANALISI STRUMENTALI PER LA VALUTAZIONE DELLE LESIONI INIZIALI DELLO SMALTO

Esistono numerose tecniche ad alta risoluzione per lo studio *in vitro* dello smalto dentale in grado di fornire informazioni macro e micro-strutturali, elementari e chimiche come la microspettroscopia Raman, la microtomografia computerizzata (μ -CT), il test di microdurezza Vickers e la Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) combinata con Spettroscopia a Dispersione di Energia (EDS). (Vitiello et al. 2024) Di seguito nel dettaglio verrà illustrato il funzionamento del SEM combinato con EDS, tecniche che sono state impiegate per lo studio sperimentale di questa Tesi di Laurea.

4.1 Microscopia elettronica a Scansione

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) consente di ottenere informazioni qualitative sulla morfologia dei campioni grazie alla sua capacità di creare immagini ad alto ingrandimento (*Figura 10*).

Il SEM rappresenta uno strumento importante per la ricerca in Odontoiatria, poiché è particolarmente adatto allo studio della microstruttura dei tessuti dentali, come lo smalto e la dentina. Il SEM utilizza un fascio di elettroni per esaminare la superficie di un campione, i quali vengono focalizzati in un punto molto piccolo, permettendo di ottenere immagini ad alta risoluzione della morfologia della superficie, come nel caso dello smalto dentale, fornendoci informazioni qualitative sulla morfologia dei prismi dello smalto. In combinazione con la microscopia SEM, viene utilizzata un'altra tecnica analitica che è la Spettroscopi a Dispersione di Energia EDS, che permette di individuare la composizione elementare della superficie analizzata e quantificare il contenuto minerale. (Vitiello et al. 2022)

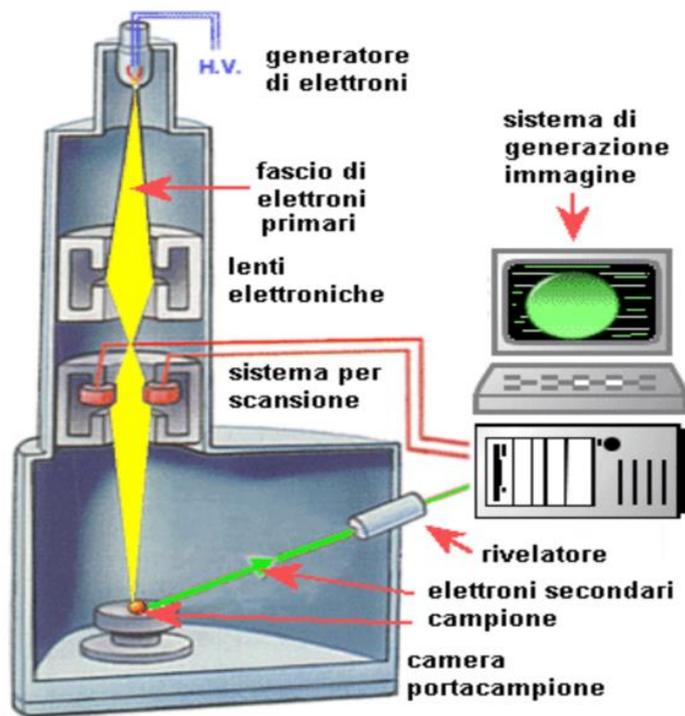


Figura 10 - Schema funzionamento di un SEM microscopio.

5. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

5.1 Obiettivo dello studio

Lo studio sperimentale condotto in questa Tesi di Laurea ha come obiettivo la valutazione dell'efficacia di quattro diversi agenti remineralizzanti ad uso professionale, attualmente disponibili in commercio, applicati su lesioni iniziali artificiali dello smalto umano. Per simulare l'ambiente del cavo orale ed avere una valutazione più attendibile, è stato utilizzato 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 analisi strutturale SEM combinata con analisi elementare EDS. Questo studio sperimentale potrà essere utile nella gestione clinica delle lesioni iniziali dello smalto.

5.2 Materiali e Metodi

5.2.1 Preparazione del campione

Dieci molari umani, estratti presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche dell'Università Politecnica delle Marche, sono stati raccolti per lo studio. Tutti i pazienti sono stati informati in anticipo che i loro denti estratti sarebbero stati utilizzati per scopi scientifici, ed è stato ottenuto il consenso scritto prima dell'esperimento. Per la selezione, sono stati applicati i seguenti criteri di inclusione: integrità delle superfici buccale e linguale, assenza di usura dello smalto, lesioni traumatiche e assenza di anomalie di volume, forma e struttura. Nei denti selezionati, i tessuti molli rimanenti, i detriti e le macchie sono stati rimossi con strumenti manuali e conservati in una soluzione di cloramina allo 0,5% p/p (NH₂Cl) a temperatura ambiente.

Tutti i campioni sono stati immersi per 72 ore in una soluzione demineralizzante a pH 4,3 al fine di creare una lesione iniziale artificiale dello smalto. Dopo la creazione della lesione artificiale, i campioni sono stati divisi casualmente in 6 gruppi (n = 2 denti per gruppo) e trattati con diversi agenti remineralizzanti ad uso professionale, a seconda del gruppo assegnato:

- **Gruppo A:** VARDIS Curodont Repair (vVARDIS, Professional, Switzerland), gel contenente oligopeptide P11⁴;
- **Gruppo B:** PRGA (Shofu ING, Kyoto Japan), pasta per profilassi contenente filler bioattivo S-PRG;
- **Gruppo C:** ELMEX GEL (Colgate – Palmolive, USA), gel contenente fluoruro amminico (NH₄F) e fluoruro di sodio (NaF) (1,25% F);
- **Gruppo D:** VOCO PROFLUORIDE (VOCO GmbH, Cuxhaven, Germania), vernice contenente fluoruro di sodio (NaF) al 5%;
- **Gruppo E:** gruppo controllo, smalto demineralizzato non sottoposto a trattamento remineralizzante.

Nella Tabella 1 vengono descritte le composizioni chimiche dei materiali testati.

Tabella 1 - Composizione chimica dei materiali testati.

GRUPPO	TRATTAMENTO	INGREDIENTI
A	VARDIS Curodont™ Repair GEL (vVARDIS, Professional,Switzerland)	Peptide P11 ⁴ (amino acid sequence: Ace-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln-NH ₂)
B	PRGA (Shofu ING, Kyoto Japan)	Glicerina, polvere di diamante (1µm), ossido di alluminio, S-PRG filler, acqua purificata, agente viscosizzante
C	ELMEX GEL (Colgate – Palmolive, USA)	Diidrofluoruro di bis-(idrossietil)-amminopropil-N-idrossietil-ottadecilammina, idrofluoruro di ottadecilammina, fluoruro sodico
D	VOCO PROFLUORIDE Varnish (VOCO GmbH, Cuxhaven,Germany)	Fluoruro di sodio – 22600 ppm F

5.2.2 Trattamento del campione

In seguito alla formazione della lesione, i campioni (Gruppi A-D) sono stati sottoposti nella superficie vestibolare ad applicazione dell'agente remineralizzante per 5 minuti usando un microbrush. Nello specifico , per il gruppo A prima del trattamento con l'agente remineralizzante, è stata eseguita pretrattamento della superficie con acido ortofosforico al 37% per 20 sec, seguito da risciacquo, come indicato dal produttore (*Figura 11*).



Figura 11 – Applicazione agente remineralizzante e conservazione in provette contenenti soluzioni remineralizzante.

Tutti i campioni, dopo l'applicazione dell'agente remineralizzante, sono stati sottoposti a un protocollo di ciclo del pH con soluzioni alternate di demineralizzazione e remineralizzazione per 7 giorni consecutivi al fine di simulare le variazioni del pH che si verificano nel microambiente orale. In un ciclo di 24 ore, i campioni sono stati immersi individualmente per 21 ore in una soluzione di remineralizzazione ($1,5 \text{ mL}^{-1}$ di calcio, $0,9 \text{ mL}^{-1}$ di fosfato, 150 mL^{-1} di cloruro di potassio in $0,02 \text{ mL}^{-1}$ di tampone cacodilico, $0,02 \text{ }\mu\text{gF/mL}$ e 1 mL/mm^2) ($\text{pH} = 7$) e per 3 ore immersi in una soluzione di demineralizzazione ($2,0 \text{ mL}^{-1}$ di calcio e fosfato in 75 mL^{-1} di tampone acetato, $0,03 \text{ }\mu\text{gF/mL}$ e 3 mL/mm^2) ($\text{pH} = 4,3$).

5.3 Analisi SEM-EDS

Dopo essere stati sottoposti al ciclo del pH per 7 giorni, i campioni sono stati preparati per essere osservati al SEM.

I campioni sono stati montati su supporti di alluminio, dorati e quindi osservati al SEM ZEISS SUPRA 40 (Zeiss, Oberkochen, Germania) presso il Centro per la microscopia elettronica-(CISMIN) del Dipartimento SIMAU, Università Politecnica delle Marche, (Ancona, Italia). Sono state acquisite immagini SEM per valutare la micro-morfologia della superficie dello smalto a due ingrandimenti: 1000x e 2000x.

La caratterizzazione chimica della superficie è stata eseguita mediante EDS utilizzando EDAX Element Microanalysis (AMETEK GmbH, EDAX Business Unit, Weiterstadt, Germania). L'analisi EDS per ciascun campione con i seguenti parametri operativi: distanza di lavoro di 15 mm, tensione di accelerazione di 20 kV e ingrandimento 3000x. Il grado di mineralizzazione è stato valutato misurando la quantità di fosforo (P) e calcio (Ca) e calcolando il loro rapporto (Ca/P) nei campioni trattati. I risultati sono stati riportati come valore medio e deviazione standard.

5.4 Analisi statistica

I risultati EDS sono stati analizzati utilizzando statistiche descrittive e le inferenze statistiche tra i gruppi sperimentali mediante il test *one way-ANOVA* (analisi della varianza) seguita dal *Tukey's test*, utilizzando il software statistico Prism8 (GraphPad Software, CA, USA). La significatività statistica è stata impostata a $p < 0,05$.

6. RISULTATI

L'analisi SEM della micromorfologia di superficie dello smalto ha mostrato notevoli differenze tra i gruppi testati (*Figura 12*).

Il gruppo E, gruppo controllo, sottoposto a demineralizzazione per creare la lesione cariosa iniziale, presenta estese alterazioni superficiali con una estesa dissoluzione dell'area interprismatica dovuta al processo di demineralizzazione e la presenza di numerose microporosità di superficie. Nel gruppo A trattato con oligopeptide P11⁴, si nota come il materiale vada a riempire le microporosità; lo stesso meccanismo d'azione è evidenziato nel gruppo D, in cui si evidenzia una parziale ricostituzione della sostanza interprismatica che era stata persa durante la creazione della lesione iniziale.

Nel gruppo B sono visibili dei depositi di materiale di forma sferica sulla superficie dello smalto, che permettono di ristrutturare una parte delle microporosità. Tuttavia, a differenza del gruppo A e D, nel gruppo B è evidente una maggiore deposizione del materiale sulla superficie dello smalto. Infine, il gruppo C, trattato con fluoruro amminico (NH₄F) e fluoruro di sodio (NaF), mostra una completa riorganizzazione della morfologia dei prismi dello smalto, una superficie più omogenea con aspetto tipico dello smalto prismatico, con zone prismatiche ed interprismatiche ben ricostituite.

Inoltre, mediante la valutazione EDS è stata eseguita l'analisi della composizione dei depositi di materiale presenti sulle superfici per valutare le componenti elementari che costituiscono il materiale testato (*Figura 13*). Gli elementi ritrovati sono in linea con quanto riportato dalle ditte produttrici. In particolare, in tutti i gruppi il materiale testato contiene fluoro (F) sebbene sia in quantità diverse. Il gruppo B, rispetto agli altri gruppi, contiene una quantità di F molto bassa ma contiene anche altri elementi come il silicio (Si), l'alluminio (Al) e il potassio (K). Inoltre, tutti i gruppi, tranne il gruppo A contengono sodio (Na).

I risultati dell'analisi statistica del rapporto Ca/P valutati tramite EDS sono mostrati nella (*Tabella 2*). L'analisi ANOVA ha evidenziato che tutti i gruppi testati hanno il rapporto Ca/P maggiore rispetto alla lesione cariosa iniziale; pertanto, tutti i gruppi evidenziano una mineralizzazione ($p < 0.05$). Tra i gruppi testati, il gruppo D è

statisticamente diverso da tutti gli altri gruppi, mentre non si evidenziano differenze statisticamente significativa tra il gruppo A e il gruppo D.

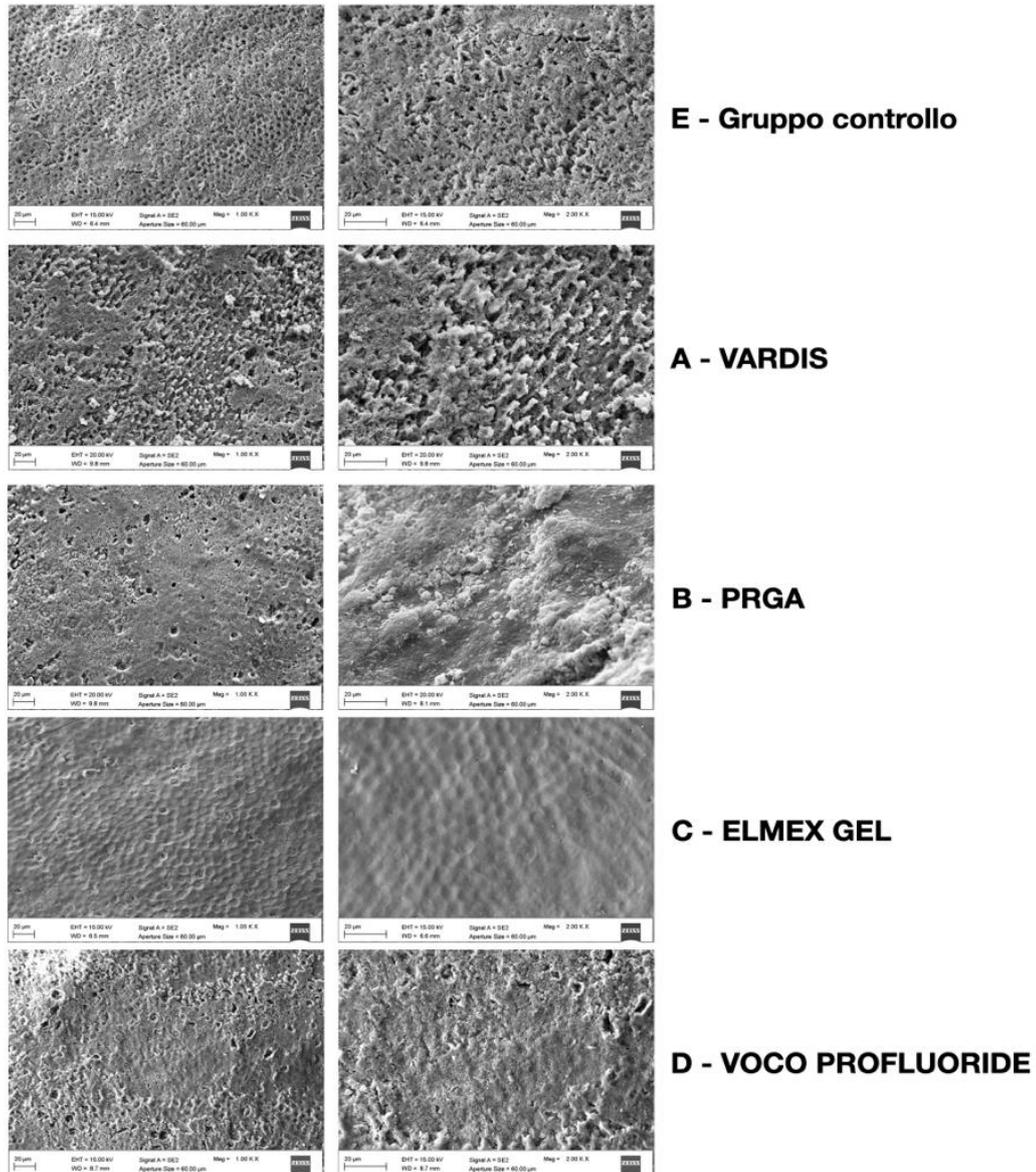


Figura 12 - Micrografie SEM a ingrandimenti 1000x (sinistra) e 2000x (destra) della lesione cariosa iniziale e dei gruppi testati (A-VARDIS, B-PRGA, C-ELMEX GEL, D-VOCO PROFLUORIDE). In particolare, nella lesione cariosa iniziale è visibile il tipico smalto demineralizzato, con la presenza di microporosità e la distruzione della sostanza interprismatica; nei gruppi A e D è visibile una parziale riorganizzazione dei prismi dello smalto, con la deposizione di tags di materiale nelle microporosità. Il gruppo B evidenzia una buona ricostituzione dei prismi dello smalto con la presenza di microsfele di materiale sulla superficie dello smalto. Il gruppo C mostra una omogenea superficie dello smalto con la ricostituzione della sostanza interprismatica e la morfologia di superficie simile a quella dello smalto sano.

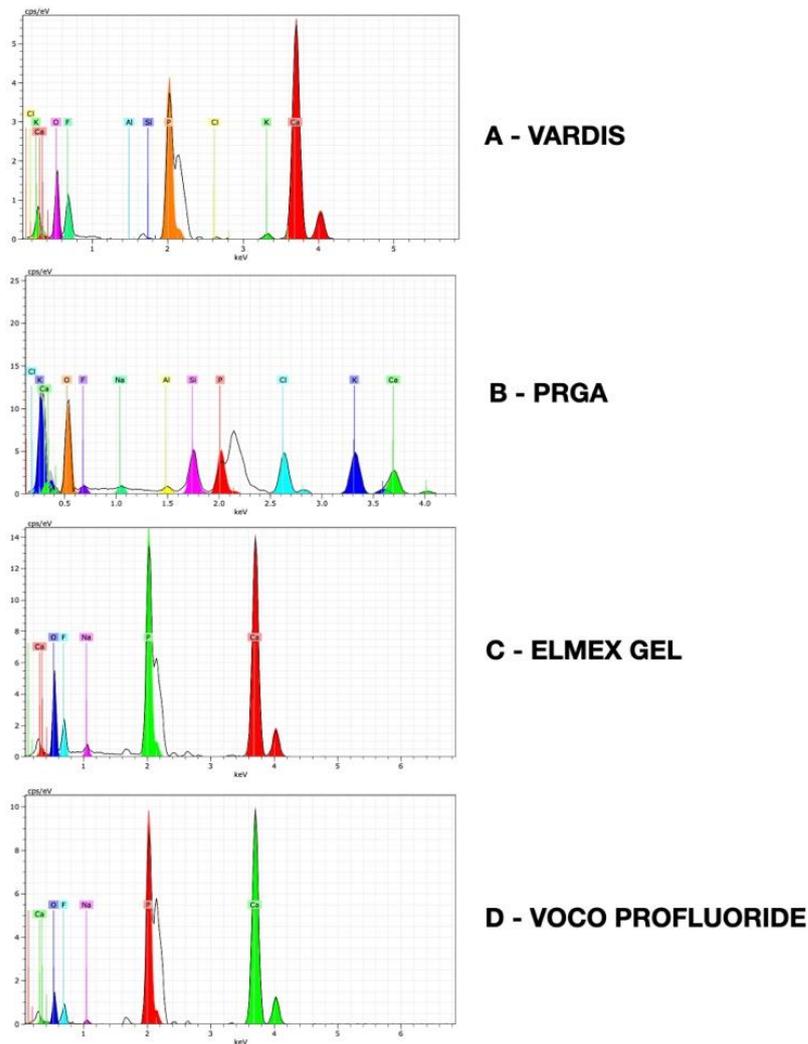


Figura 13- Composizione elementare dei residui di materiale presenti sulla superficie dello smalto nei vari gruppi.

Tabella 2 - Valori dei dati ottenuti dalle misurazioni EDS di tutti i gruppi in % in peso espressi come media \pm deviazione standard del rapporto Ca/P: lesione cariosa iniziale (demineralizzato); Gruppo A (VARDIS), Gruppo B (PRGA), Gruppo C (ELMEX GEL); Gruppo D (VOCO PROFLUORIDE). Le diverse lettere in apice indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$).

	Ca/P
Lesione cariosa iniziale	1.74 ± 0.04^a
Gruppo A	2.08 ± 0.07^b
Gruppo B	2.19 ± 0.06^c
Gruppo C	2.33 ± 0.08^d
Gruppo D	2.04 ± 0.03^b

7. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, l'Odontoiatria si è concentrata sulla gestione non invasiva delle lesioni cariose iniziali, utilizzando agenti remineralizzanti per promuovere la remineralizzazione dei tessuti duri con deficit minerale e prevenire la progressione della malattia. Sebbene la saliva rappresenti una fonte importante di ioni per la remineralizzazione, ha un potenziale remineralizzante relativamente basso sulle lesioni iniziali dello smalto.

Negli ultimi decenni, sono stati sviluppati nuovi biomateriali in grado di garantire migliori risultati clinici nella gestione delle lesioni cariose iniziali.

In questo contesto, l'obiettivo di questa Tesi di Laurea è stato quello di valutare dopo 7 giorni di pH cycling, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo, l'effetto di una singola applicazione di quattro agenti remineralizzanti ad uso professionale attraverso analisi SEM-EDS.

In questo studio è stato utilizzato un modello di pH cycling per simulare le fluttuazioni del pH che avvengono nella cavità orale e 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.

I risultati SEM del Gruppo controllo E, smalto con lesione artificiale iniziale, hanno confermato che il processo di demineralizzazione ha portato a cambiamenti nella morfologia di superficie dello smalto con una perdita di sostanza nei nuclei dei prismi e nella zona interprismatica. È evidente sulla superficie una disposizione disordinata dei cristalli di HA residui. A conferma di ciò, l'analisi elementare EDS (*Figura 13*) ha chiaramente indicato una riduzione della percentuale del rapporto Ca/P (1.74 ± 0.04), considerando come riferimento il valore del rapporto Ca/P dello smalto sano pari a 2.13 ± 0.17 (Poorni et al. 2010).

Le immagini SEM dei gruppi A-D hanno dimostrato differenze qualitative nella riorganizzazione dello smalto, peculiari per ciascun tipo di agente remineralizzante testato.

Il gruppo A, trattato con oligopeptide P11⁴, dimostra la capacità di creare dei tags di riempimento negli spazi vuoti lasciati dalla demineralizzazione dello smalto

contribuendo così ad una parziale ricostituzione. Come descritto nello studio di Dawasaz et al. (2022), il P11⁴ è in grado di auto-assemblarsi in una matrice fibrosa viscosa all'interno della lesione cariosa a causa del suo pH acido, formando una struttura tridimensionale che funge da scaffold per la formazione di cristalli di HA. I risultati ottenuti dall'analisi dall'EDS del gruppo A, sono in accordo in quanto mostrano un aumento percentuale del rapporto Ca/P.

Questo processo di mineralizzazione sarebbe in grado di indurre la rigenerazione tissutale dall'interno della lesione stessa. A sostegno di ciò, lo studio di Sedlakova Kondelova et al. (2020) ha evidenziato come in 6 mesi l'oligopeptide P11⁴ induce ad una regressione delle carie facilitando la formazione di nuovi cristalli di HA nella lesione iniziale. In questo studio la valutazione del potenziale remineralizzante è stata osservata solo dopo sette giorni. Pertanto, è possibile affermare che già dopo un breve periodo dall'applicazione, il processo di mineralizzazione ha determinato dei buoni risultati. In futuri studi sarebbe interessante osservare, l'effetto del prodotto dopo un periodo più lungo.

Il gruppo B, trattato con filler S-PRG, rispetto ai gruppi A, C e D, ha mostrato la presenza sulla superficie di depositi sferici di materiale in grado di occludere parzialmente le microporosità della superficie.

Come descritto da Imazato et al. (2023), il filler in vetro-ionomerico pre-reattivo superficiale (PRG), è una particella di vetro fine a tre strati, composta da uno strato esterno di SiO₂, seguito da una fase di vetro-ionomerico pre-reattivo e da un core di vetro di fluoro-boro-alluminio silicato, che una volta applicato sulla superficie del dente, rilascia ioni Sr²⁺, Na⁺, BO₃³⁻, Al³⁺ e SiO₃²⁻ ad alte concentrazioni come hanno dimostrato anche gli studi di Ishigure et al. (2021) e Uo, Wada, e Asakura (2017). Pertanto, il filler S-PRG potrebbe biologicamente promuovere la formazione di cristalli di apatite.

Infatti, dall'analisi EDS realizzata in modo puntiforme sui depositi di PRG residui sulla superficie, è emersa la presenza di diversi elementi come il Si, l'Al, il K, che vengono rilasciati nel cavità orale proprio dal materiale stesso, migliorandone la resistenza all'attacco acido.

Il gruppo C, trattato con NH₄F e NaF, ha ottenuto i migliori risultati in termini di ricostituzione della morfologia dello smalto con una superficie uniforme e ben

organizzata, simile a quella dello smalto sano. Difatti, il meccanismo mineralizzante è dato dalla capacità di questi composti di rilasciare ioni fluoro (F-) e formare strati protettivi di CaF₂ sulla superficie dello smalto, come è dimostrato nello studio di Marinho et al. (2015), in cui le sfere di CaF₂ agiscono come reservoir di fluoro, dimostrando la sua azione mineralizzante. D'accordo con Amaechi et al. (2020) il materiale testato è stato altamente efficace nel mineralizzare la lesione cariosa iniziale, portando ad un significativo aumento di minerali rispetto agli altri agenti testati. Infatti, il gruppo C ha mostrato il valore di Ca/P più elevato, indicando il miglior effetto mineralizzante tra i gruppi testati.

Il gruppo D, trattato con NaF al 5% (22600 ppm), ha mostrato una ricostituzione parziale delle microporosità, con un discreto recupero della sostanza interprismatica ma con una riorganizzazione dei prismi migliore rispetto al gruppo B ma non totalmente omogenea rispetto al gruppo C. Non si evidenziano differenze statisticamente significative con il gruppo A per l'analisi EDS.

In generale, la superficie e la riorganizzazione della struttura prismatica dello smalto dei gruppi A, B e D sono apparse meno omogenee e regolari rispetto ai risultati ottenuti nel gruppo C.

Uno dei limiti di questo studio è identificabile nella difficoltà di simulare le condizioni in vivo della cavità orale. In effetti, in questo studio è stata testata una soluzione di saliva priva di specie microbiche con capacità limitata di replicare la complessità del biofilm batterico e della pellicola acquisita presenti nella cavità orale.

Tuttavia, i risultati ottenuti restano incoraggianti in quanto dimostrano che i quattro agenti testati, purché con meccanismi di azione e molecole attive differenti, hanno presentato un buon potenziale remineralizzante dopo una singola applicazione.

8. CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti in questo studio *in vitro* è possibile affermare che sulle lesioni iniziali dello smalto, che presentano una perdita di sostanza prismatica e interprismatica, gli agenti testati, a base di oligopeptide P11⁴, filler S-PRG, NH₄F combinato con NaF e NaF al 5% hanno avuto una buona efficacia mineralizzante. I prodotti sono stati impiegati con singola applicazione e analizzati mediante SEM-EDS dopo 7 giorni di pH cycling.

Il gruppo C, trattato con un gel a base di NH₄F combinato NaF, ha mostrato i risultati migliori in termini di uniformità e riorganizzazione della struttura prismatica dello smalto rispetto ai gruppi A, B e D.

I gruppi A e D, trattati rispettivamente con oligopeptide P11⁴ e NaF al 5%, hanno mostrato un riempimento delle porosità dello smalto demineralizzato mediante la deposizione di tags di materiale con parziale ricostituzione della superficie. Il gruppo B, trattato con S-PRG, ha mostrato la presenza di depositi sferici di materiale sulla superficie, che sono andati a ricoprire parzialmente le microporosità dello smalto demineralizzato.

Le tecniche analitiche SEM-EDS utilizzate in questo studio hanno dimostrato essere un valido supporto nella valutazione qualitativa e quantitativa del potenziale remineralizzante dei tessuti duri del dente.

BIBLIOGRAFIA

- Alkilzy, Mohammad, Ghalib Qadri, Christian H. Splieth, e Ruth M. Santamaría. 2023. «Biomimetic Enamel Regeneration Using Self-Assembling Peptide P11-4». *Biomimetics* 8 (3): 290. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8030290>.
- Allen, Danielle N, Courtney M Fine, Malorie N Newton, Faizan Kabani, Kathleen B Muzzin, e Kayla M Reed. 2021. «Resin Infiltration Therapy: A Micro–Invasive Treatment Approach for White Spot Lesions» 95 (6).
- Alshahrani, I, Syed Sadatullah, Amanullah Mohammed, Togoo Ra, S Kaleem, e Mohammad HAMEED. 2019. «Changes in Essential Salivary Parameters in Patients Undergoing Fixed Orthodontic Treatment: A Longitudinal Study». *Nigerian journal of clinical practice* 22 (maggio):707–12. https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_606_18.
- Alsubhi, Hassan, Mohammad Gabbani, Abdulsalam Alsolami, Mohammed Alotaibi, Jameel Abuljadayel, Waleed Taju, e Omair Bukhari. 2021. «A Comparison between Two Different Remineralizing Agents against White Spot Lesions: An In Vitro Study». *International Journal of Dentistry* 2021 (1): 6644069. <https://doi.org/10.1155/2021/6644069>.
- Amaechi, Bennett T. 2015. «Remineralization Therapies for Initial Caries Lesions». *Current Oral Health Reports* 2 (2): 95–101. <https://doi.org/10.1007/s40496-015-0048-9>.
- Amaechi, Bennett T., Parveez Ahamed AbdulAzees, Linda O. Okoye, Frederic Meyer, e Joachim Enax. 2020. «Comparison of Hydroxyapatite and Fluoride Oral Care Gels for Remineralization of Initial Caries: A pH-Cycling Study». *BDJ Open* 6 (1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41405-020-0037-5>.
- Amodeo, Alessio, Giuseppe Duvia, Laura Buccarella, Andrea Butti, e Dino Re.

2021. «Prevenzione nel paziente ortodontico», dicembre.

Andrade, Rosa, R.D. Nogueira, Maria Menezes-Oliveira, Cesar Lepri, e V.R. Geraldo-Martins. 2019. «Use of Resin Infiltrate for the Treatment of White spot Lesions on Dental Enamel: Case Report». *Journal of Health Sciences* 21 (giugno):134. <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2019v21n2p134-138>.

Ardelean, Lavinia, Codruta Tigmeanu, Alexandra Moga, e Laura-Cristina Rusu. 2024. «White Spot Lesions of Carious Etiology». In . <https://doi.org/10.5772/intechopen.115148>.

Asquino, Natalia, e Fabiana Villarnobo. 2019. «Cepillos Interdentales, de La Teoría a La Práctica. Revisión de Literatura e Indicaciones Clínicas». *Odontoestomatología* 21 (33): 46–53. <https://doi.org/10.22592/ode2019n33a6>.

Bartlett, John D. 2013. «Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates». *International Scholarly Research Notices* 2013 (1): 684607. <https://doi.org/10.1155/2013/684607>.

Besnard, Cyril, Ali Marie, Sisini Sasidharan, Robert A. Harper, Richard M. Shelton, Gabriel Landini, e Alexander M. Korsunsky. 2023. «Synchrotron X-ray Studies of the Structural and Functional Hierarchies in Mineralised Human Dental Enamel: A State-of-the-Art Review». *Dentistry Journal* 11 (4): 98. <https://doi.org/10.3390/dj11040098>.

Carvalho, Raquel Nogueira De, Aline Dos Santos Letieri, Thiago Isidro Vieira, Thais Maria Pires Dos Santos, Ricardo Tadeu Lopes, Aline De Almeida Neves, e Luciana Pomarico. 2018. «Accuracy of Visual and Image-Based ICDAS Criteria Compared with a Micro-CT Gold Standard for Caries Detection on Occlusal Surfaces». *Brazilian Oral Research* 32 (0). <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0060>.

Chikkanarasaiah, Nagarathna, Shakuntala Siddaiah, e Naveena Preethi. 2019. «An Update on Current Remineralizing Agent». *Oral health and dental management* 14 (marzo):183–87.

Comar, Livia Picchi, Marina Franciscan Gomes, Naiana Ito, Priscila Aranda Salomão, Larissa Tercília Grizzo, e Ana Carolina Magalhães. 2012. «Effect of NaF, SnF₂, and TiF₄ Toothpastes on Bovine Enamel and Dentin Erosion-Abrasion In Vitro». *International Journal of Dentistry* 2012:134350.

<https://doi.org/10.1155/2012/134350>.

Crawford, Peter JM, Michael Aldred, e Agnes Bloch-Zupan. 2007. «Amelogenesis imperfecta». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2 (aprile):17.

<https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-17>.

Dawasaz, Ali Azhar, Rafi Ahmad Togoo, Zuliani Mahmood, Ahmad Azlina, e Kannan Thirumulu Ponnuraj. 2022a. «Effectiveness of Self-Assembling Peptide (P11-4) in Dental Hard Tissue Conditions: A Comprehensive Review». *Polymers* 14 (4): 792. <https://doi.org/10.3390/polym14040792>.

———. 2022b. «Effectiveness of Self-Assembling Peptide (P11-4) in Dental Hard Tissue Conditions: A Comprehensive Review». *Polymers* 14 (4): 792.

<https://doi.org/10.3390/polym14040792>.

Diniz, Michele, Jonas Rodrigues, e Adrian Lussi. 2012. «Traditional and Novel Caries Detection Methods». In . <https://doi.org/10.5772/38209>.

Disha, Valbona, Marin Zaimi, Elizana Petrela, e Fatbardha Aliaj. 2024. «An Investigation into the Prevalence of Enamel Hypoplasia in an Urban Area Based on the Types and Affected Teeth». *Children* 11 (4): 474.

<https://doi.org/10.3390/children11040474>.

Duverger, Olivier, Elia Beniash, e Maria I. Morasso. 2016. «Keratins as components of the enamel organic matrix». *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 52–54:260–65. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.12.007>.

Emiliani, Federico, e Roberto Turrini. 2024. *Black&White*.

Farooq, Imran, e Amr Bugshan. 2021. «The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review».

F1000Research 9 (giugno):171. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22499.3>.

- Featherstone, John D. B., Yasmi O. Crystal, Pamela Alston, Benjamin W. Chaffee, Sophie Doméjean, Peter Rechmann, Ling Zhan, e Francisco Ramos-Gomez. 2021. «A Comparison of Four Caries Risk Assessment Methods». *Frontiers in Oral Health* 2 (aprile):656558. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.656558>.
- Gomez, J. 2015. «Detection and diagnosis of the early caries lesion». *BMC Oral Health* 15 (Suppl 1): S3. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S3>.
- Guzmán-Armstrong, Sandra, Jane Chalmers, e John J. Warren. 2010. «White Spot Lesions: Prevention and Treatment». *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 138 (6): 690–96. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.07.007>.
- Habelitz, Stefan. 2015. «Materials Engineering by Ameloblasts». *Journal of dental research* 94 (marzo). <https://doi.org/10.1177/0022034515577963>.
- Hand, Arthur R. 2015. «Fundamentals of Oral Histology and Physiology».
- Hegde, Shreya, Roma e M, e Deepa Shetty. 2016. «Non-fluoridated remineralization agents in dentistry» 8 (agosto):884–87.
- Heymann, Gavin C., e Dan Grauer. 2013. «A Contemporary Review of White Spot Lesions in Orthodontics». *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 25 (2): 85–95. <https://doi.org/10.1111/jerd.12013>.
- Imazato, Satoshi, Toshiyuki Nakatsuka, Haruaki Kitagawa, Jun-Ichi Sasaki, Satoshi Yamaguchi, Shuichi Ito, Hiroki Takeuchi, Ryota Nomura, e Kazuhiko Nakano. 2023. «Multiple-Ion Releasing Bioactive Surface Pre-Reacted Glass-Ionomer (S-PRG) Filler: Innovative Technology for Dental Treatment and Care». *Journal of Functional Biomaterials* 14 (aprile):236. <https://doi.org/10.3390/jfb14040236>.
- Ishigure, Hiroshi, Harumi Kawaki, Kohei Shintani, Kyohei Ueno, Masako Mizuno-Kamiya, Eiji Takayama, Masato Hotta, Nobuo Kondoh, e Toru Nikaido. 2021. «Effects of multi-components released from S-PRG filler on the activities of human dental pulp-derived stem cells». *Dental Materials Journal* 40 (6): 1329–37. <https://doi.org/10.4012/dmj.2020-390>.

- Jullien, Sophie. 2021. «Prophylaxis of caries with fluoride for children under five years». *BMC Pediatrics* 21 (Suppl 1): 351. <https://doi.org/10.1186/s12887-021-02702-3>.
- Khatri, Monisha, Shreya Kishore, S. Nagarathinam, Suvetha Siva, e Vanita Barai. 2022. «White Spot Lesions and Remineralization». In *Dentistry*, a cura di Lavinia Cosmina Ardelean e Laura Cristina Rusu. Vol. 10. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101372>.
- Khoroushi, Maryam, e Marzie Kachuie. 2017. «Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients». *Contemporary Clinical Dentistry* 8 (1): 11–19. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_216_17.
- Kunin, Anatoly A, Anna Yu Evdokimova, e Natalia S Moiseeva. 2015. «Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries». *The EPMA Journal* 6 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s13167-014-0025-8>.
- Lacruz, Rodrigo S., Stefan Habelitz, J. Timothy Wright, e Michael L. Paine. 2017. «Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease». *Physiological Reviews* 97 (3): 939–93. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>.
- Lopes, Pedro C., Teresa Carvalho, Ana T. P. C. Gomes, Nelio Veiga, Letícia Blanco, Maria José Correia, e Anna Carolina Volpi Mello-Moura. 2024. «White spot lesions: diagnosis and treatment – a systematic review». *BMC Oral Health* 24 (gennaio):58. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-03720-6>.
- Macey, Richard, Tanya Walsh, Philip Riley, Anne-Marie Glenny, Helen V Worthington, Janet E Clarkson, e David Ricketts. 2018. «Tests to detect and inform the diagnosis of caries». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018 (12): CD013215. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013215>.
- Machale, Priyanka, Sahana Shetiya, e Deepti Agarwal. 2013. «The Incipient Caries». *Journal of Contemporary Dentistry* 3 (gennaio):20–24. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10031-1029>.
- Maheswari, S. Uma, Jacob Raja, Arvind Kumar, e R. Gnana Seelan. 2015. «Caries

management by risk assessment: A review on current strategies for caries prevention and management». *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 7 (Suppl 2): S320–24. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.163436>.

Marinho, Valeria CC, Helen V Worthington, Tanya Walsh, e Lee-Yee Chong. 2015. «Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015 (6): CD002280. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002280.pub2>.

Marya, Anand, Adith Venugopal, Mohamed Isaqali Karobari, e Dinesh Rokaya. 2022. «White Spot Lesions: A Serious but Often Ignored Complication of Orthodontic Treatment». *The Open Dentistry Journal* 16 (1): e187421062202230. <https://doi.org/10.2174/18742106-v16-e2202230>.

McFadden, Jeremy Ryan, e David Michael Ames. 2023. «Assessment of Ammonium Fluoride as a Mobile Phase Additive for Sensitivity Gains in Electrospray Ionization». *Analytical Science Advances* 4 (11–12): 347–54. <https://doi.org/10.1002/ansa.202300031>.

Meyer, Frederic, Joachim Enax, Matthias Epple, Bennett T. Amaechi, e Barbara Simader. 2021. «Cariogenic Biofilms: Development, Properties, and Biomimetic Preventive Agents». *Dentistry Journal* 9 (8): 88. <https://doi.org/10.3390/dj9080088>.

Meyer, Frederic, Erik Schulze Zur Wiesche, Bennett Amaechi, Hardy Limeback, e Joachim Enax. 2024. «Caries Etiology and Preventive Measures». *European Journal of Dentistry* 18 (marzo). <https://doi.org/10.1055/s-0043-1777051>.

Moradian-Oldak, J., e A. George. 2021. «Biom mineralization of Enamel and Dentin Mediated by Matrix Proteins». *Journal of Dental Research* 100 (10): 1020–29. <https://doi.org/10.1177/00220345211018405>.

Moradian-Oldak, Janet. 2012. «Protein-Mediated Enamel Mineralization». *Frontiers in Bioscience* 17 (7): 1996. <https://doi.org/10.2741/4034>.

Mortensen, Diana, Katrine Dannemand, Svante Twetman, e Mette Keller. 2014. «Detection of Non-Cavitated Occlusal Caries with Impedance Spectroscopy and

Laser Fluorescence: an In Vitro Study». *The open dentistry journal* 8 (febbraio):28–32. <https://doi.org/10.2174/1874210601408010028>.

Orilisi, Giulia, Flavia Vitiello, Valentina Notarstefano, Michele Furlani, Nicole Riberti, Riccardo Monterubbianesi, Tiziano Bellezze, et al. 2023. «Multidisciplinary Evaluation of the Remineralization Potential of Three Fluoride-Based Toothpastes on Natural White Spot Lesions». *Clinical Oral Investigations* 27 (12). <https://doi.org/10.1007/s00784-023-05334-2>.

Paepegaey, A, Trevor Day, A Boulding, R Harris, M.L. Barker, e Philip Bellamy. 2013. «In vitro comparison of stannous fluoride, sodium fluoride, and sodium monofluorophosphate dentifrices in the prevention of enamel erosion». *The Journal of clinical dentistry* 24 (gennaio):73–78.

Pepla, Erlind, Lait Kostantinos Besharat, Gaspare Palaia, Gianluca Tenore, e Guido Migliau. 2014. «Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature». *Annali di Stomatologia* 5 (3): 108–14.

Petsi, Georgia, Sotiria Gizani, Svante Twetman, e Katerina Kavvadia. 2014. «Cariogram Caries Risk Profiles in Adolescent Orthodontic Patients with and without Some Salivary Variables». *The Angle Orthodontist* 84 (5): 891–95. <https://doi.org/10.2319/080113-573.1>.

Philip, Nebu. 2019. «State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management». *Caries Research* 53 (3): 284–95. <https://doi.org/10.1159/000493031>.

Poorni, Saravanan, R. Anil Kumar, P. Shankar, Rajamani Indira, e S. Ramachandran. 2010. «Effect of 10% Sodium Ascorbate on the Calcium: Phosphorus Ratio of Enamel Bleached with 35% Hydrogen Peroxide: An in Vitro Quantitative Energy-Dispersive X-Ray Analysis». *Contemporary Clinical Dentistry* 1 (4): 223. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.76388>.

Ramya, Ramadoss, Padmanaban Rajashree, e Subramanian Balakumar. 2021. «Role

of bioglass in enamel remineralization: Existing strategies and future prospects-A narrative review», giugno. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34904>.

Sedlakova Kondelova, Paulina, Alaa Mannaa, Claudine Bommer, Marwa Abdelaziz, Laurent Daeniker, Enrico di Bella, e Ivo Krejci. 2020. «Efficacy of P11-4 for the treatment of initial buccal caries: a randomized clinical trial». *Scientific Reports* 10 (novembre):20211. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77057-3>.

Shahmoradi, Mahdi, Luiz Bertassoni, Hunida Elfallah, e Michael Swain. 2014. «Fundamental Structure and Properties of Enamel, Dentin and Cementum». In , 511–47. https://doi.org/10.1007/978-3-642-53980-0_17.

Shannon, Ira L., e Wm. B. Wescott. 1976. «Laboratory Effectiveness of Different Types of Fluoride Compounds». *Australian Dental Journal* 21 (3): 231–36. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1976.tb05755.x>.

Singer, Lamia, Ahmed Fouda, e Christoph Bourauel. 2023. «Biomimetic approaches and materials in restorative and regenerative dentistry: review article». *BMC Oral Health* 23 (febbraio):105. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-02808-3>.

Smith, C. E., e A. Nanci. 1995. «Overview of Morphological Changes in Enamel Organ Cells Associated with Major Events in Amelogenesis». *The International Journal of Developmental Biology* 39 (1): 153–61.

Smith, Claire E. L., James A. Poulter, Agne Antanaviciute, Jennifer Kirkham, Steven J. Brookes, Chris F. Inglehearn, e Alan J. Mighell. 2017. «Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways». *Frontiers in Physiology* 8 (giugno). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00435>.

Spinola, Manuela Da Silva, Sabrina Elise Moecke, Natália Rivoli Rossi, Toshiyuki Nakatsuka, Alessandra Bühler Borges, e Carlos Rocha Gomes Torres. 2020. «Efficacy of S-PRG Filler Containing Varnishes on Enamel Demineralization Prevention». *Scientific Reports* 10 (1): 18992. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76127-w>.

Srivastava, Kamna, Tripti Tikku, Rohit Khanna, e Kiran Sachan. 2013. «Risk factors

and management of white spot lesions in orthodontics». *Journal of Orthodontic Science* 2 (2): 43–49. <https://doi.org/10.4103/2278-0203.115081>.

Telang, Ajay, Sabarinathan Jaganathan, Vinayak Pishipati, Lahari Telang, e Jayashri Nerali. 2021. «Evaluating the Performance of Dental Students with Different Levels of Clinical Experience in Learning ICDAS». *The Journal of Contemporary Dental Practice* 22 (aprile):89–92. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-3026>.

«The Early Enamel Carious Lesion | Pocket Dentistry». s.d. Consultato 14 ottobre 2024. <https://pocketdentistry.com/the-early-enamel-carious-lesion/>.

Uo, Motohiro, Takahiro Wada, e Kiyotaka Asakura. 2017. «Structural analysis of strontium in human teeth treated with surface pre-reacted glass-ionomer filler eluate by using extended X-ray absorption fine structure analysis». *Dental Materials Journal* 36 (2): 214–21. <https://doi.org/10.4012/dmj.2016-266>.

Veneri, F. 2024. «Fluoride and Caries Prevention: A Scoping Review of Public Health Policies». *ANNALI DI IGIENE MEDICINA PREVENTIVA E DI COMUNITÀ* 36 (3): 270–80. <https://doi.org/10.7416/ai.2024.2593>.

Vitiello, Flavia, Giulia Orilisi, Valentina Notarstefano, Michele Furlani, Nicole Riberti, Tiziano Bellezze, Florence Carrouel, Angelo Putignano, e Giovanna Orsini. 2024. «A Modern Multidisciplinary Method to Characterize Natural White Spot Lesions with 2D and 3D Assessments: A Preliminary Study». *Journal of Personalized Medicine* 14 (maggio):542. <https://doi.org/10.3390/jpm14050542>.

Vitiello, Flavia, Vincenzo Tosco, Riccardo Monterubbianesi, Giulia Orilisi, Maria Laura Gatto, Scilla Sparabombe, Lucia Memé, Paolo Mengucci, Angelo Putignano, e Giovanna Orsini. 2022. «Remineralization Efficacy of Four Remineralizing Agents on Artificial Enamel Lesions: SEM-EDS Investigation». *Materials* 15 (13): 4398. <https://doi.org/10.3390/ma15134398>.

Wang, Jun-xiang, Yan Yan, e Xiu-jing Wang. 2012. «Clinical Evaluation of Remineralization Potential of Casein Phosphopeptide Amorphous Calcium Phosphate Nanocomplexes for Enamel Decalcification in Orthodontics». *Chinese*

Medical Journal 125 (22): 4018. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.22.020>.

Wright, John. 2023. «Enamel Phenotypes: Genetic and Environmental Determinants». *Genes* 14 (febbraio):545. <https://doi.org/10.3390/genes14030545>.

Yin, Kaifeng, e Michael L Paine. 2017. «Bicarbonate Transport During Enamel Maturation», agosto. <https://doi.org/DOI 10.1007/s00223-017-0311-2>.

Yon, Madeline, Shiqian Gao, Jieyi Chen, Duangporn Duangthip, Edward Lo, e Chun-Hung Chu. 2019. «Medical Model in Caries Management». *Dentistry Journal* 7 (aprile):37. <https://doi.org/10.3390/dj7020037>.

Yu, Ollie Yiru, Irene Shuping Zhao, May Lei Mei, Edward Chin-Man Lo, e Chun-Hung Chu. 2017. «A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research». *Dentistry Journal* 5 (2): 20. <https://doi.org/10.3390/dj5020020>.