

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
Dipartimento di Scienze Bio-Mediche – Sezione Microbiologia

**DOTTORATO DI RICERCA INTERNAZIONALE IN
SCIENZE MICROBIOLOGICHE E BIOCHIMICHE**
Ciclo XXVI

Dott. SALVATORE PRIVITERA

**IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE BATTERICHE
DELLA PLACCA SUBGENGIVALE QUALE FATTORE DI
RISCHIO PER PATOLOGIE PARODONTALI IN DONNE
CON VARIAZIONI ORMONALI FISIOLOGICHE E
PARAFISIOLOGICHE**

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore:
Prof. Adriana Garozzo

Tutor:
Prof. Annamaria Speciale

TRIENNIO 2011 – 2013

SOMMARIO

INTRODUZIONE	Pag. 5
MENOPAUSA	Pag. 7
Definizione e classificazione	Pag. 7
Ormoni sessuali femminili	Pag. 9
Sintomatologia	Pag. 9
Approccio clinico-diagnostico	Pag. 10
Valutazione dello stato ormonale	Pag. 12
Terapia Ormonale Sostitutiva	Pag. 13
MODIFICAZIONI DEL CAVO ORALE	Pag. 17
Pubertà	Pag. 17
Ciclo mestruale	Pag. 18
Gravidanza	Pag. 19
Menopausa	Pag. 19
CONDIZIONI ORALI PATOLOGICHE ASSOCIATE ALLA MENOPAUSA	Pag. 21
Osteoporosi	Pag. 21
<i>Terapia con bifosfonati</i>	Pag. 22
Parodontopatie: parodontite	Pag. 25
<i>Definizione e classificazione</i>	Pag. 25
<i>Parodontite cronica</i>	Pag. 25
<i>Parodontite aggressiva</i>	Pag. 26

<i>Parodontite ulcero-necrotica</i>	Pag. 26
<i>Diagnosi</i>	Pag. 27
<i>Terapia</i>	Pag. 28
<i>Parodontiti e malattie sistemiche</i>	Pag. 29
<i>Parodontite e parto pretermine</i>	Pag. 31
<i>Parodontite e fumo</i>	Pag. 31
Parodontopatie: gengivite propriamente detta e gengivite desquamativa	Pag. 33
Stomatopirosi	Pag. 34
Xerostomia	Pag. 35
AGENTI EZIOLOGICI E PATOGENESI DELLA PARODONTITE	Pag. 37
PARODONTITE, MENOPAUSA E TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA	Pag. 42
OBIETTIVI DELLA RICERCA	Pag. 43
MATERIALI E METODI	Pag. 44
Pazienti	Pag. 44
Esame Clinico Odontoiatrico	Pag. 46
<i>Visita odontoiatrica</i>	Pag. 46
<i>Modalità di prelievo e trasporto dei campioni</i>	Pag. 47
Esame microbiologico: analisi molecolare dei campioni	Pag. 48
<i>Ceppi batterici</i>	Pag. 48
<i>Estrazione del DNA</i>	Pag. 48
PCR	Pag. 50

<i>Elettroforesi su gel d'agarosio</i>	Pag. 53
RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag. 55
CONCLUSIONI	Pag. 59
BIBLIOGRAFIA	Pag. 61
TABELLE	Pag. 69

INTRODUZIONE

Agli inizi del 1900, l'aspettativa di vita della donna coincideva con la conclusione dell'età fertile e, comunque, per quelle poche donne che superavano la menopausa iniziava un declino biologico e della vita di relazione che di fatto le estraniava dal contesto sociale. Oggi, nel mondo industrializzato, più del 95% delle donne raggiunge l'età della menopausa, il 60% vive più di 75 anni e l'età media di vita della donna raggiunge gli 82 anni circa.

La salute e la qualità di vita della donna in menopausa e in postmenopausa rappresentano quindi un tema sempre più emergente; sia per l'alta casistica; sia perchè, in questa fase della vita, alle patologie legate all'incremento dell'età e agli effetti della deprivazione ormonale, si aggiungono una serie di fattori di derivazione sociale, relazionale, psicologica, di ruolo, ecc., che impongono spesso la necessità di riassetto di equilibri comunque complessi, e, quasi sempre, faticosamente raggiunti.

Sono le donne infatti, ad avere una peggior percezione della propria salute. Il divario, sia fisico che psicologico rispetto agli uomini, aumenta con l'età, anche per l'effetto diretto della maggiore prevalenza di malattie croniche, soprattutto fra le donne anziane.

I cambiamenti che avvengono durante la vita di una donna devono promuovere un'attenzione speciale nella cura della salute. In particolare, la salute orale delle donne, correlata alla menopausa, è un campo di pratica medica e di indagine scientifica in rapida espansione. Si tratta di un settore di grande importanza sociale e di impatto nazionale e globale in paesi sviluppati e in quelli in via di sviluppo. Bisogna infatti considerare che la salute parodontale è collegata allo stato di salute generale di una persona.

Così come le cure a cui una donna ricorre dalla pubertà alla menopausa sono diverse, anche quelle legate al mantenimento della salute orale possono variare.

Le fluttuazioni ormonali durante questi periodi possono avere ripercussioni sui tessuti parodontali (osso alveolare, legamento parodontale, cemento e gengiva) che fungono da supporto ai denti. Questi cambiamenti possono aumentare la suscettibilità alla malattia parodontale e possono richiedere particolari attenzioni nella salute orale.

L'esame della letteratura scientifica evidenzia come gli ormoni sessuali femminili, riuscendo ad agire come modulatori della risposta dell'ospite, determinano una maggiore suscettibilità alle infezioni: in particolare, a livello parodontale, estrogeni e progesterone producono una maggiore tendenza alla vasodilatazione e quindi all'edema, un'aumentata produzione di prostaglandine, una ridotta cheratinizzazione delle cellule epiteliali con conseguente riduzione della funzionalità delle cellule neutrofile, determinando una flogosi. Il contemporaneo accumulo di placca nel solco gengivale, in queste condizioni, produrrà un aumento dei segni clinici dell'infiammazione.

Pertanto, i diversi aspetti legati al climaterio e alla menopausa occupano nella pratica odontoiatrica quotidiana una crescente importanza, poiché, a causa dell'allungamento della vita media, è notevolmente aumentato il numero di donne in menopausa, che, attualmente, per un cambio di cultura e mentalità influenzato in maniera significativa dai media, richiedono un miglior livello di qualità di vita e un controllo più accurato dei propri denti.

È necessario quindi che l'odontoiatra moderno acquisisca capacità diagnostiche, terapeutiche e relazionali decisamente di qualità superiore e che, attraverso un adeguato training, orienti la donna a sottoporsi ad appropriata diagnosi e terapia delle patologie che possono interessare i tessuti, molli e duri, orali e periorali.

MENOPAUSA

Definizione e classificazione

La menopausa viene definita come la cessazione del ciclo mestruale per esaurimento della funzione follicolare ovarica. Essa può essere spontanea o indotta da chirurgia, chemioterapia e/o radioterapia pelvica. Per praticità il ciclo di vita e di invecchiamento continuo della donna viene suddiviso in periodi:

- **Climaterio:** fase della vita della donna che precede e segue per un periodo variabile la transizione dalla fase riproduttiva a quella non riproduttiva.
- **Transizione menopausale:** periodo caratterizzato da modificazioni del ciclo (lunghezza) e dell'assetto endocrino (aumento dei livelli di FSH, ormone follicolo-stimolante); termina con la cessazione delle mestruazioni.
- **Perimenopausa:** periodo intorno alla menopausa, da 2-10 anni prima, fino a 12 mesi dopo la cessazione del ciclo.
- **Menopausa:** cessazione del ciclo mestruale da almeno 12 mesi consecutivi, indipendentemente da altre cause.
- **Postmenopausa:** periodo che intercorre tra la menopausa e l'inizio della senilità, che inizia in media verso i 65 anni d'età.

Il passaggio dalla fase riproduttiva della vita di una donna allo stato di transizione menopausale e alla postmenopausa comporta molte modificazioni, sia fisiche che psichiche.

Risulta difficile scindere i cambiamenti indotti dalla menopausa da quelli dovuti all'invecchiamento. Modificazioni connesse al metabolismo ormonale in relazione all'invecchiamento, alcune condizioni, come l'obesità, il diabete, i disordini tiroidei e l'ipertensione, si sviluppano più frequentemente nella mezza età.

Lo stato di transizione menopausale si caratterizza per un'alterata secrezione ormonale, che si manifesta con irregolarità del ciclo mestruale fino alla completa cessazione delle mestruazioni.

Oltre che un normale evento della vita della donna, la menopausa può anche essere la conseguenza di un intervento chirurgico di asportazione delle ovaie (menopausa chirurgica) o di un'irradiazione delle stesse (menopausa attinica) o ancora di un trattamento medico, ormonale o chemioterapico, come quelli che vengono frequentemente effettuati per la cura dei tumori mammari e che comportano la distruzione dei follicoli ovarici (menopausa chimica).

Un particolare caso di menopausa chirurgica è rappresentato dall'asportazione dell'utero con conservazione delle ovaie. In questo caso, la donna non ha più mestruazioni e non può più procreare, ma la produzione di ormoni ovarici prosegue normalmente fino all'età della menopausa naturale. (1)

L'età media della menopausa spontanea si aggira intorno ai 51 anni ed è in gran parte predeterminata geneticamente, anche se fattori etnici, familiari ed ambientali possono in qualche modo condizionarne la comparsa. (2)

Studi statistici affermano che nel 2020 la durata media della vita della donna sarà intorno agli 85 anni, ed è necessario, quindi, che questi anni in più siano vissuti con una qualità di vita del tutto soddisfacente. L'integrazione di un adeguato stile di vita, di un ambiente sociale non emarginante e di opportuni supporti medici, da definirsi caso per caso, in base alle caratteristiche di ciascuno, potranno permettere la conquista di questo risultato. (3, 4)

Ormoni sessuali femminili

Gli ormoni sono molecole di regolazione secrete da ghiandole endocrine in risposta a stimoli specifici ed esercitano la loro azione su organi bersaglio di cui regolano le attività enzimatiche, partecipando in tal modo a processi fondamentali come: la riproduzione, lo sviluppo di organi e tessuti, la produzione di energia, la sua utilizzazione o il suo mantenimento sotto forma di riserve.

I principali ormoni sessuali della donna, che si distinguono a seconda della struttura chimica, sono: l'Estradiolo (E_2); l'Estriolo (E_3); l'Estrone (E_1).

Nella donna fertile l' E_2 si trova in circolo in equilibrio con l' E_1 . In menopausa, per il venir meno della funzione ovarica e nei casi di aumentata sintesi periferica, ad es. nelle donne obese, l' E_1 diventa l'estrogeno predominante e il rapporto E_2/E_1 si riduce fino ad invertirsi. L' E_3 è l'estrogeno meno attivo, anche se, nella donna in gravidanza diventa invece l'estrogeno più importante, perché prodotto direttamente dall'unità feto-placentare. La fonte di produzione del Progesterone, invece, è il corpo luteo, ed è per questo che lo steroide viene secreto solo nella fase luteinica del ciclo mestruale. (5)

Sintomatologia

Nella maggior parte delle donne, la ridotta produzione di estrogeni è accompagnata da reazioni vasomotorie (vampate di calore, sudorazioni), insonnia, sbalzi d'umore, cambiamenti nella composizione delle mucose (secchezza vaginale, infezioni della vescica urinaria), modificazioni corporee (riduzione della massa muscolare, aumento del grasso corporeo con accumulo prevalentemente nell'addome).

I notevoli cambiamenti che avvengono durante la menopausa in vari distretti corporei, come quelli adiposo, osseo e vascolare, spesso si associano a un

aumento del rischio di insorgenza di patologie. (6, 7) Con il passare degli anni, si osserva una maggiore incidenza di malattie cardiovascolari, la possibile comparsa di osteoporosi, un indebolimento delle capacità cognitive, ridotta elasticità e secchezza della pelle. È bene ricordare che non tutte le donne presentano i sintomi descritti e che molti di questi disturbi compaiono in maniera sfumata e sono ben tollerati. Molto può dipendere dall'approccio psicologico con cui si affronta questo evento della vita. Il significato negativo che la donna stessa generalmente attribuisce alla menopausa spesso si accompagna ad una ridotta stima di sé stessa, ad un'insoddisfazione della vita attuale, all'ansia per il futuro. (8, 9, 10)

Il rischio di depressione è anche aumentato da diversi fattori che non sono legati alla menopausa di per sé, ma piuttosto all'occorrenza di eventi stressanti che si manifestano con maggior frequenza in questa età della vita, come, ad esempio, la perdita di persone care, l'invecchiamento dei genitori, l'abbandono della casa da parte dei figli, l'abbandono dell'attività lavorativa per un meno gratificante lavoro domestico. Questi importanti aspetti psicologici che ricorrono in maniera più o meno sfumata nella maggior parte delle donne giunte alla menopausa spontanea acquistano una valenza ancora maggiore nelle donne in cui la menopausa è stata indotta precocemente, soprattutto se come conseguenza di una malattia tumorale. (11, 12)

Approccio clinico-diagnostico

La diagnosi di menopausa è posta in presenza di un'amenorrea irreversibile da almeno 12 mesi. È una diagnosi clinica e retrospettiva che non richiede alcun esame complementare (salvo in caso di isterectomia). La realizzazione di un test al progesterone permette, in assenza di emorragia di privazione all'interruzione, di oggettivare l'ipoestrogenismo.

Per valutare lo stato di salute della donna in questo periodo è importante:

- identificare i fattori di rischio, in particolare quelli specifici della menopausa e ad essa correlati;
- fare diagnosi precoce di malattia;
- individuare le terapie necessarie e stabilire un piano di prevenzione.

Nell'osservazione delle donne in perimenopausa è necessaria la raccolta dettagliata della storia medica, psicologica e sociale, inclusa la storia familiare. Queste informazioni anamnestiche, da una parte possono condizionare l'espressione clinica della peri-menopausa e dall'altra possono indirizzare nell'approccio preventivo ed eventualmente terapeutico.

L'anamnesi ereditaria e familiare è di grandissima importanza per certe malattie che hanno un carattere strettamente ereditario, nel senso che colpiscono più membri della stessa famiglia. Essa è utile per la prevenzione di patologie oncologiche, in particolare per il tumore mammario, ovarico e del colon; per patologie cardiovascolari e di osteoporosi; per patologie di natura endocrina (tiroidea o autoimmune), neurologica (Alzheimer), ed eventuale storia di depressione.

L'anamnesi personale rappresenta l'insieme delle notizie riguardanti la presenza di malattie quali i dismetabolismi e la malattia cardiovascolare, la patologia gastrointestinale e da malassorbimento, le epatopatie, l'insufficienza renale, le malattie neurologiche, la cefalea e le pregresse condizioni di ipoestrogenismo e di patologia autoimmune.

Inoltre non bisogna trascurare la presenza di situazioni di stress, affaticamento, la difficoltà nel dormire, i problemi di vista o relativi al cavo orale e ai denti, il diradamento o la perdita di capelli, le modificazioni del peso corporeo, la riduzione di altezza, la facilità alle cadute, le pregresse fratture e la storia di osteoporosi.

L'anamnesi ginecologica consente di valutare il ciclo mestruale, la data dell'ultima mestruazione, l'eventuale presenza di sanguinamenti uterini anomali, di fibromi e precedenti interventi chirurgici ginecologici, notizie su problemi urinari o vaginali. La data dell'ultimo Pap-test e della mammografia, l'uso corrente o pregresso di contraccettivi sono da tenere in considerazione assieme al numero di gravidanze, di parti pretermine e aborti, e alle eventuali complicazioni il parto o nel post-partum.

L'anamnesi fisiologica comprende informazioni sulle principali funzioni fisiologiche dalla nascita al momento della visita (percezione del proprio stato di salute, informazioni sull'alimentazione, esercizio fisico, stato di stress, consumo di caffè, alcool, fumo e droghe). (13, 14)

Valutazione dello stato ormonale

Allo stato attuale, nessun test per la valutazione della funzione ovarica da solo, predice e diagnostica lo stato di menopausa. Di solito la storia clinica, e le caratteristiche dei cicli mestruali insieme alla sintomatologia sono sufficienti a confermare la menopausa. Si rendono necessari pertanto:

1. Valutazione della tiroide: può essere condotta in quelle donne che presentano irregolarità del ciclo e/o vampate di calore in perimenopausa;
2. Valutazione dell'assetto ormonale:
 - 2a. FSH: questo valore, estremamente fluttuante in perimenopausa, si può elevare ai range menopausali, ma può tornare a valori bassi anche in pochi giorni, settimane o mesi;
 - 2b. Estradiolo: i suoi livelli sono irregolari in perimenopausa e la sua ampia variabilità può essere in parte responsabile della sintomatologia;

2c. Estrone: in caso di scarsa risposta alla terapia, la misurazione dell'estrone sierico può essere utile. Livelli inferiori a 150 pg/ml dopo 4h dalla somministrazione di estrogeno orale suggeriscono un anomalo metabolismo degli estrogeni;

2d. LH (ormone luteinizzante) e Progesterone: in peri-menopausa e menopausa hanno limitato valore diagnostico se usati come singoli test. LH si eleva più tardivamente rispetto allo FSH;

2e. Androgeni: la misura del testosterone può essere utile quando è riferita una riduzione della libido e del desiderio sessuale, escluse altre cause. Deve essere valutata la sua biodisponibilità, quindi il testosterone totale e la quota libera (free testosterone);

2f. il DHEAS (Deidroepiandrosterone) è indicatore della produzione surrenalica di androgeni e la sua determinazione può essere utile in caso si pensi ad una insufficiente produzione di androgeni surrenalici. (15, 16)

Terapia Ormonale Sostitutiva

Gran parte dei sintomi che la donna riferisce in menopausa derivano dalla carenza di estrogeni. Malgrado siano conosciuti prevalentemente come ormoni sessuali, queste sostanze, in realtà, agiscono su una moltitudine di sistemi e tessuti influenzando la fisiologia femminile quasi in ogni distretto. La Terapia Ormonale Sostitutiva (TOS) ha rappresentato finora la terapia di elezione per la prevenzione ed il trattamento delle problematiche menopausali, attraverso il tentativo di mimare, mediante la somministrazione di estrogeni naturali (estradiolo, estrone ed estriolo) o sintetici (etinilestradiolo e mestranolo), associati o meno ad altri ormoni, i cosiddetti progestinici (medrossiprogesterone), la produzione ormonale ovarica dell'età fertile, al fine

di annullare o quantomeno attutire, le possibili conseguenze indesiderate legate alla carenza ormonale postmenopausale. La loro prescrizione ha lo scopo di migliorare la qualità della vita nella donna con sintomatologia legata allo stato di menopausa. (17, 18)

In Italia, solo l'8% circa delle donne di età compresa tra i 50 e i 55 anni fa uso di terapie ormonali sostitutive e la metà di queste sospende la terapia prima di un anno. (19)

Nel nord Europa la percentuale delle utilizzatrici delle terapie ormonali varia tra il 25 e il 35%. La scarsa fiducia data a queste terapie è causata dalla paura del rischio di tumori, specie di quello della mammella o di effetti collaterali come le perdite irregolari di sangue o l'aumento di peso. (20, 21)

Questi trattamenti devono essere, oltre che personalizzati, anche concordati, dopo una esauriente informazione e attenta valutazione dei benefici, dei possibili effetti collaterali e degli eventuali rischi. (22)

I due ormoni femminili (estrogeni e progestinici) possono essere utilizzati in modo ciclico, cioè tre settimane di trattamento e una di pausa, oppure in modo continuo. La via di somministrazione può essere orale, transdermica e vaginale.

Altre terapie ormonali possono permettere di personalizzare ulteriormente il trattamento, utilizzandole in alternativa oppure in sequenza, la cosiddetta "terapia a staffetta". (16, 23, 24)

Tra i farmaci impiegati nel trattamento della menopausa vi sono quindi il tibolone, i SERMs ("selective estrogen receptor modulators", modulatori selettivi dei recettori per gli estrogeni), i fitoestrogeni.

Il tibolone è un farmaco di sintesi per uso orale che possiede deboli attività estrogeniche, progestiniche e androgeniche. Ha effetti sui sintomi vasomotori, sulla distrofia dei genitali, sull'umore e sul desiderio sessuale. È stata dimostrata anche l'efficacia nel prevenire la perdita ossea, ma essendo un

farmaco di relativa recente introduzione (1992), mancano dati certi sulla sua efficacia nei tempi lunghi sulla riduzione dell'incidenza delle fratture. (25)

I SERMs sono un gruppo di farmaci - il più studiato e utilizzato è il raloxifene - che agiscono sugli “organi bersaglio” degli estrogeni in modo selettivo. Sull'endometrio (la mucosa interna dell'utero) e sulla mammella si comportano come anti-estrogeni, riducendo pertanto il rischio di tumori a carico di questi organi. Sul tessuto osseo e su alcuni parametri relativi al rischio cardiovascolare hanno un'azione simile a quella degli estrogeni. Non avendo alcun effetto sui sintomi vasomotori e distrofici urogenitali, sono indicati principalmente per la prevenzione e il trattamento dell'osteoporosi. (26)

I fitoestrogeni sono composti vegetali che vengono trasformati in estrogeni nell'intestino e sono ampiamente propagandati negli Stati Uniti come sostituti naturali degli estrogeni nella terapia della post-menopausa. In natura i fitoestrogeni sono presenti in circa 300 piante, sotto forma di precursori, i quali vengono successivamente metabolizzati nell'organismo nei corrispondenti principi attivi. I componenti attualmente noti dei fitoestrogeni sono i comestoni, gli isoflavoni, i lignami, i lattoni dell'acido resorcilico. Sono presenti in moltissimi vegetali, quali i legumi, le radici, la frutta, la verdura, ed hanno un'azione simile anche se più blanda dell'estradiolo prodotto dall'ovaio, ma non per questo sono meno efficaci. Tali sostanze migliorano i sintomi vasomotori, soprattutto se di intensità lieve/media. Pare abbiano anche un'azione preventiva nell'osteoporosi, sebbene i risultati degli studi finora condotti non abbiano ancora chiarito sufficientemente quanto siano efficaci e sicuri. (27)

In definitiva, è stato provato che la TOS apporta benefici causando la riduzione/scomparsa dei sintomi climaterici e di alcuni disturbi psicologici, sessuali e legati alla distrofia urogenitale; tutto ciò contribuisce al miglioramento della qualità della vita. (28) Rimangono degli interrogativi riguardo alla reale possibilità di prevenzione della malattia di Alzheimer. Anche se i dati epidemiologici e clinici finora disponibili indicano che la terapia ormonale può

essere in grado di ridurre alcuni meccanismi favorevoli all'instaurarsi e allo sviluppo della demenza senile. (29) Per quanto riguarda le malattie cardiocircolatorie, recenti studi, anche contrastanti tra di loro, hanno ridimensionato l'effetto preventivo delle terapie ormonali. (30, 31, 32) Due ricerche appena pubblicate sostengono che le donne sottoposte a TOS hanno un rischio maggiore del 30% di sviluppare un tumore al cervello. È la sconcertante conclusione del Danish Cancer Research Centre, secondo il quale, più a lungo si segue la terapia e più probabilità si hanno di ammalarsi: il rischio aumenta del 70% se la TOS viene seguita per 10 anni o più. Al termine delle analisi condotte su circa un migliaio di casi di meningioma diagnosticato in donne fra i 55 e gli 84 anni fra il 2000 e il 2009, i ricercatori danesi sostengono che l'uso della TOS a lungo termine, in particolare in associazione estro-progestinica, può aumentare il rischio del più comune fra i tumori cerebrali. (33, 34)

MODIFICAZIONI DEL CAVO ORALE

Le variazioni ormonali nella donna possono essere attribuite a cause fisiologiche, quali la pubertà, le mestruazioni, la gravidanza e la stessa menopausa.

Gli ormoni sessuali femminili modulano la maturazione dei caratteri sessuali primari e secondari nella donna, ma interagiscono anche con organi bersaglio diversi, fra cui la cavità orale. La ragione di tale relazione è dovuta alla presenza di recettori per estrogeni e progesterone nella gengiva umana. La stimolazione del parodonto può determinare fisiologicamente manifestazioni quali: dolori diffusi, alterata modulazione dei quattro gusti principali (dolce, salato, amaro e acido), bocca secca, perdita degli elementi dentari e riassorbimento dell'osso alveolare.

L'esame della letteratura scientifica evidenzia come questi ormoni riescano ad agire come modulatori della risposta dell'ospite, determinando una maggiore suscettibilità alle infezioni durante le fasi più importanti della vita della donna. (35, 36, 37, 38)

Pubertà

Durante la pubertà, l'impennata dei valori ormonali, che rimane relativamente costante per tutta la vita riproduttiva delle donne, può determinare ipertrofia e ipersensibilità gengivale, nonché infiammazioni del cavo orale, mentre, come dimostrato in diversi studi, l'impiego protratto di contraccettivi orali favorisce le gengiviti. (39, 40, 41, 42)

Clinicamente la gengiva appare arrossata e infiammata lungo il colletto di uno o più denti, con rigonfiamento edematoso delle papille interdentali, aree in cui il cibo, la placca e il tartaro sono depositati, e con sanguinamento in seguito

a qualsiasi minimo insulto (masticazione o spazzolamento dei denti). Il dolore è di solito assente. (39, 43)

Alterazioni del microbiota orale sono state riportate durante la pubertà e possono essere attribuite a variazioni del microambiente, in particolare nella risposta del tessuto gengivale alla concentrazione di ormoni sessuali e nella capacità di alcune specie batteriche (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Capnocytophaga* spp., *Eikenella* spp., *Prevotella* spp., *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus* spp.) di sfruttare la maggiore concentrazione di ormoni presenti. (42)

Ciclo mestruale

L'aumento di progesterone durante il ciclo mestruale può determinare modificazioni rilevanti nel cavo orale. La manifestazione più frequente ed elementare che si può osservare durante questo periodo è costituita dalla gengivite ricorrente (gengivite dismenorroica), che è caratterizzata da arrossamento e edema della gengiva marginale e da emorragie spontanee. Queste forme regrediscono in breve tempo accentuando le comuni pratiche di igiene orale. Altre modificazioni orali includono infezioni da herpes ricorrenti, ulcere aftose e parotiti. (39, 42, 44)

In alcuni studi sono state esaminate le alterazioni del microbiota orale durante il ciclo mestruale, ma, a causa della scarsa casistica, tali studi non hanno dato risultati statisticamente significativi. (45, 46)

Gravidanza

La gravidanza provoca numerose variazioni a livello del cavo orale, legate principalmente all'aumento di estrogeni e progesterone che nell'ultimo trimestre raggiungono livelli anche 30 volte superiori a quelli di un normale ciclo mestruale. Il cavo orale rappresenta un bersaglio per questi ormoni, per la presenza di specifici recettori a livello gengivale.

Durante la gengivite gravidica le gengive si presentano gonfie, congestionate, doloranti e sanguinano al minimo trauma. Il sanguinamento e il dolore possono indurre a spazzolare sempre di meno i denti con un conseguente peggioramento della situazione a causa della ritenzione di placca. (47, 48)

Oltre ai visibili cambiamenti del corpo femminile, gli ormoni sessuali possono cambiare le modalità di risposta delle gengive e dei tessuti molli della bocca verso gli attacchi batterici, in particolare di quelli anaerobi dove la *Prevotella intermedia*, tra i principali responsabili della parodontite, occupa un ruolo rilevante. (42, 48, 49, 50)

Menopausa

Questo periodo, caratterizzato da cambiamenti fisiologici importanti nel corpo della donna, è legato principalmente alla ridotta produzione di estrogeni. Alcuni cambiamenti significativi, come già accennato, riguardano proprio il cavo orale, col presentarsi di manifestazioni quali dolori diffusi, infiammazione delle gengive, sensazione di bruciore, alterata modulazione dei quattro gusti principali e bocca secca. La gengiva rappresenta quindi un tessuto bersaglio per l'azione degli ormoni steroidei. (5, 16, 39, 42)

Questi fenomeni sono dovuti, oltre che alle alterazioni ormonali, a carenze di calcio e vitaminiche, e anche alla possibile interferenza di farmaci. (36)

Pertanto problematiche quali osteoporosi, parodontopatie, stomatopirosi e xerostomia vanno monitorate, prevenute ed eventualmente curate con protocolli specifici dal clinico.

Gli studi condotti finora riportano che nelle tasche parodontali delle donne in menopausa la popolazione microbica è prevalentemente costituita, in percentuale variabile, da *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. (36, 42, 44, 53)

CONDIZIONI ORALI PATOLOGICHE ASSOCIATE ALLA MENOPAUSA

La cessazione del flusso mestruale determina una netta riduzione dei livelli ormonali; in particolare il calo degli estrogeni sembra essere associato ad alcune condizioni orali patologiche che sono rappresentate da:

- osteoporosi;
- parodontopatie (parodontiti, gengiviti, gengivite desquamativa);
- stomatopirosi. (8, 9, 10, 36)

Osteoporosi

L'osteoporosi è una malattia caratterizzata da un basso contenuto di calcio nelle ossa, con conseguente fragilità dello scheletro e predisposizione alle fratture.

La relazione fra menopausa e osteoporosi è nota da tempo. Gli estrogeni intervengono infatti nella regolazione della quantità di calcio presente nell'osso; venendo meno il loro controllo, il calcio nell'osso si riduce, lasciando una struttura porosa e fragile. Anche se i meccanismi di azione non sono del tutto chiari, si pensa che gli estrogeni promuovano la morte cellulare programmata degli osteoclasti e quindi riducano il loro periodo di attività. Il trattamento con estrogeni o con altri agenti serve a prevenire la perdita ossea attraverso il blocco della produzione di citochine in osteoblasti e a promuovere l'apoptosi degli osteoclasti. Oltre alla carenza di estrogeni esistono altri fattori di rischio accertati in grado di causare o aggravare l'osteoporosi, quali l'inattività fisica, l'alimentazione povera di calcio, la magrezza costituzionale, il fumo di sigaretta, l'elevato consumo di alcol, trattamenti prolungati con farmaci cortisonici e la predisposizione genetica. I denti sono radicati in strutture ossee, per cui il loro deterioramento, inevitabile nelle persone anziane, porta con sé l'indebolimento del loro ancoraggio, rendendo più facili le infiltrazioni nelle strutture del

parodonto, che diventano quindi più suscettibili all'attacco batterico, responsabile dei danni gengivali. (51, 52)

Un terzo delle donne di età superiore a 60 anni è affetto da osteoporosi postmenopausa. L'alterazione dell'equilibrio tra calcio e fosfato a causa di un carente assorbimento di calcio con la dieta e l'aumento dell'escrezione di calcio dovuto a un abbassamento dei livelli degli estrogeni possono spiegare alcuni cambiamenti a livello osseo osservati nelle donne in età postmenopausale. Tali cambiamenti coinvolgono di solito più la mandibola che l'osso mascellare e interessano anche l'ossificazione cartilaginea del condilo mandibolare, rappresentando una controindicazione all'implantologia in questa tipologia di pazienti. (51, 52, 53)

Terapia con bifosfonati

La terapia con i bisfosfonati è stata introdotta negli anni '60 per la cura di varie patologie ossee, quali, appunto l'osteoporosi, il morbo di Paget, l'osteogenesi imperfetta, il mieloma multiplo e le metastasi osteolitiche. L'utilizzo di questi farmaci è andato sempre più aumentando, tanto che, ad oggi, figurano tra i 20 farmaci più prescritti al mondo. Il loro meccanismo d'azione prevede l'inibizione del riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti, contrastando pertanto la perdita della massa ossea. Essi non vengono metabolizzati, quindi permangono nell'osso a concentrazioni elevate, anche per molto tempo. I bifosfonati sono farmaci in grado di modificare positivamente la storia naturale della malattia ossea determinando una riduzione degli eventi scheletrici e sono pertanto da considerarsi irrinunciabili nella gestione di un paziente con metastasi ossee. I più comuni bifosfonati utilizzati in terapia sono: l'alendronato, il risedronato, l'ibandronato, il pamidronato e lo zoledronato, composti dotati di elevata potenza e selettività. (54, 55)

Generalmente i bifosfonati sono ben tollerati e raramente sono in grado di causare effetti collaterali rilevanti. Recenti segnalazioni hanno tuttavia descritto

l'osteonecrosi avascolare della mascella quale effetto avverso potenzialmente grave associato alla somministrazione cronica di tali farmaci. Sebbene l'osteonecrosi sia stata finora riportata soprattutto nei pazienti sottoposti alla somministrazione endovenosa di pamidronato e/o zoledronato, un numero sempre crescente di casi è riportato tra i pazienti che assumono bifosfonati per via orale (alendronato o risedronato) per la cura dell'osteoporosi o del morbo di Paget. (56)

I primi casi segnalati di osteonecrosi dei mascellari (ONJ, "osteonecrosis of the jaw") associati alla terapia con i bisfosfonati risalgono agli anni 2003-2004. (57) I dati epidemiologici di cui disponiamo ci dicono che, ad oggi, sono stati riportati in letteratura circa 1.000 casi di ONJ di questo tipo. Per semplicità la malattia sarà definita come osteonecrosi della mandibola associata a bisfosfonati (ONJ-BP). (54, 55, 56)

La precisa sequenza patogenetica che associa l'utilizzo di bisfosfonati e l'insorgenza di ONJ-BP non è nota. Si è ipotizzato inizialmente un meccanismo ischemico/ipossico basato su un potenziale effetto antiangiogenetico dei bisfosfonati, ma in realtà il quadro anatomopatologico tende ad escludere questa possibilità. Il meccanismo patogenetico più accreditato è legato ad un preferenziale accumulo di farmaco a livello delle ossa mascellari o mandibolari dovuto all'elevato turnover che le caratterizza. È quindi possibile che una volta raggiunte concentrazioni significative di farmaco a livello di tali sedi, venga inibita l'attività osteoclastica deputata al mantenimento dell'integrità del tessuto osseo e soprattutto deputata ad innescare i processi riparativi in corso di patologia parodontale, estrazioni o interventi invasivi a livello dell'osso alveolare. (54, 58, 59)

Pertanto, la compromessa riparazione esporrebbe alla contaminazione batterica. Una interessante possibilità è che il processo inizi come una mucosite legata proprio alla elevata concentrazione di bisfosfonato nell'interfaccia osso alveolare/mucosa gengivale, con successiva ulcerazione della gengiva ed

esposizione del tessuto osseo sottostante, che sarebbe quindi esposto alla contaminazione con la flora batterica del cavo orale. (60, 61, 62)

Emerge inoltre che, tra i fattori di rischio maggiormente associati alla ONJ-BP, vi sono sicuramente gli interventi di chirurgia orale odontoiatrica (avulsioni dentarie, parodontologia, implantologia), ma anche condizioni di parodontite e scarsa igiene orale. (63, 64, 65)

Ciò si combina generalmente con una soggettiva suscettibilità alle infezioni, come nei pazienti immunocompromessi, nei neoplastici sottoposti a chemioterapia, o nei pazienti in trattamento cortisonico ad alte dosi e nei diabetici. (66, 67, 68, 69)

Certo è, che il fenomeno è in aumento ed è sempre più necessario per medici e odontoiatri avere a disposizione indicazioni precise su come rapportarsi a questa grave patologia, non semplice da diagnosticare tempestivamente e dai contorni ancora piuttosto incerti, prognosi compresa.

Parodontopatie: parodontite

Definizione e classificazione

La parodontite, una delle patologie più comuni del genere umano, è dovuta principalmente a una risposta infettivo-infiammatoria delle strutture anatomiche di sostegno del dente (osso alveolare, cemento, legamento parodontale e gengiva) in risposta all'accumulo di placca batterica, e rappresenta la principale causa di edentulismo nella popolazione.

È ormai noto che solo una sottopopolazione dei batteri che costituiscono la placca è di fatto implicata nell'eziopatogenesi delle parodontopatie, ma il discorso inerente gli agenti eziologici della parodontite merita di essere approfondito, e ciò verrà fatto in seguito.

La classificazione delle malattie parodontali ha suscitato numerosi dibattiti nei decenni scorsi, quando le informazioni sulla eziopatogenesi erano decisamente più scarse. La tendenza più recente è stata quella di classificarle in base all'età, ma si è rivelata piuttosto imprecisa e inutile. Dal 1999 è accettata la classificazione dell'*American Academy of Periodontology*, che prevede una parodontite cronica, più frequente negli adulti, e una parodontite aggressiva, più frequente nella pubertà. Un gruppo a parte è rappresentato dalle rare forme ulcero-necrotiche. La parodontite è definita localizzata se riguarda meno del 30% della bocca, viceversa è considerata generalizzata. (70)

Parodontite cronica

I segni clinici di parodontite cronica sono infiammazione gengivale, sanguinamento al sondaggio, perdita di attacco con formazione di tasca gengivale e riduzione dell'osso alveolare. Si manifesta come gengivite già nell'adolescenza, lentamente progressiva, che durante periodi di riduzione delle difese immunitarie presenta aggravamento acuto con associata perdita d'attacco. Nel corso della vita gli effetti patologici si accumulano, fino ad arrivare all'età

adulta, dove si palesano gli effetti distruttivi della malattia. L'entità di tale distruzione è funzione dei livelli di placca, fumo, stress, diabete, efficienza del sistema immunitario. Il rischio di contrarre parodontite cronica è compreso tra 3 e 7 nei tabagisti; la risposta terapeutica in tali individui ha una prognosi più sfavorevole, e l'attenuazione dell'infiammazione indotta dal fumo tende a celare la reale gravità della patologia. (71, 72)

Parodontite aggressiva

La parodontite aggressiva comprende rare forme di parodontiti caratterizzate da una progressione rapida. In età puberale si presenta generalmente come localizzata, mentre quella generalizzata è ancor più grave e colpisce principalmente i giovani adulti, ma anche pazienti più anziani. L'età non è comunque un buon discriminante per differenziare la forma cronica da quella aggressiva, in quanto condizioni igieniche particolarmente inadeguate possono causare la forma cronica anche nei bambini. Sia la forma localizzata sia la generalizzata richiedono una predisposizione genetica, ma, mentre la localizzata risulta insorgere per un'infezione da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, in quella generalizzata è più importante il ruolo di *Porphyromonas gingivalis* e di *Tannerella forsythia*. Anche nella forma aggressiva il fumo è un fattore di rischio, specialmente delle forme generalizzate. Infine, va detto che questa forma di parodontite colpisce in maniera caratteristica soprattutto i primi molari e gli incisivi. (72, 73, 74)

Parodontite ulcero-necrotica

La parodontite ulcero-necrotica, che si verifica soprattutto nei giovani (20-25 anni) dei Paesi in via di sviluppo, è una patologia distruttiva del parodonto caratterizzata da papille e margini gengivali ulcerati e necrotici, ricoperti da un materiale pseudomembranoso giallognolo. Le lesioni

necrotizzanti si sviluppano rapidamente e dolorosamente, con facilità di sanguinamento, talvolta spontaneo. La necrosi gengivale, a carico delle papille interdentali, sprofonda nell'osso alveolare coinvolgendolo. Associati alla patologia possono manifestarsi tumefazione linfonodale, febbre, malessere generale. L'igiene orale è tipicamente molto scarsa, anche perché lo spazzolamento dentale risulta provocare un forte dolore. Il decorso è generalmente acuto, e dopo l'attenuarsi della sintomatologia possono presentarsi ricorrenti episodi di riacutizzazione. Non è stata individuata alcuna specie batterica in grado di provocare di per sé la patologia, e, inoltre, la patologia non è trasmissibile con i consueti mezzi di contatto. Piuttosto, si propende per ritenere che l'effetto dei prodotti metabolici dei batteri della placca risulti esacerbato in concomitanza con malattie sistemiche (HIV, leucemia, morbillo, varicella, tubercolosi), malnutrizione, fumo, stress, depressione, scarsa igiene orale. (76, 77)

Diagnosi

La corretta diagnosi delle parodontiti è perciò fondamentale per l'impostazione di un corretto piano di trattamento e per migliorare la qualità di vita dei pazienti. La diagnosi consente, infatti, di determinare la natura, la sede, l'estensione e il grado della malattia attraverso la valutazione di segni, sintomi ed esami strumentali e di laboratorio.

La prima fase consiste nell'ispezione clinica con lo screening, volto ad individuare i pazienti che presentano la malattia. Il PSR ("Periodontal Screening and Recording") è un sistema rapido, sensibile, specifico, poco costoso e semplice, si esegue con una semplice sonda parodontale ed uno specchietto. Se il paziente risulta positivo allo screening, si procede alla fase successiva, che consiste nella valutazione parodontale vera e propria e con il sondaggio parodontale completo di tutti gli elementi dentali, che consente di stimare, attraverso la misurazione degli indici parodontali, la perdita dell'attacco

parodontale, e di verificare l'eventuale presenza di sanguinamento e di tartaro sottogengivale, ovvero dei segni patognomonic dell'inflammazione.

La valutazione si completa tramite una accurata indagine radiografica in quanto fornisce importanti informazioni, non solo sull'altezza e sulla quantità di osso residuo, ma anche sulla morfologia.

Il sondaggio parodontale deve essere quindi sempre associato ad una valutazione quantitativa e qualitativa della perdita di osso orizzontale e verticale, ottenibile tramite la divisione delle arcate dentarie in sestanti e l'esecuzione di rx endorali. Lo status radiografico sarà quindi ripetuto in fase di rivalutazione di una terapia causale, in fase di mantenimento e nella fase pre-chirurgica. (78, 79, 80)

Terapia

La terapia per la malattia parodontale si suddivide essenzialmente in una fase causale (non chirurgica) e in una eventuale fase chirurgica. La prima fase è volta ad eliminare le cause della malattia tramite un'igiene orale professionale (ablazione tartaro), in primis sopragengivale (scaling) e successivamente sottogengivale (root planing). Tali procedure si attuano tramite strumenti manuali (curettes) o vibranti (ultrasuoni) e consentono la rimozione definitiva di cemento e/o dentina ricoperti da tartaro o contaminanti batterici, rendendo la superficie radicolare liscia.

Nel caso di un danno a livello del parodonto profondo che risulta irreversibile (perdita ossea radiografica evidente) si può programmare e concordare col paziente una terapia chirurgica, che sarà diversa a seconda del tipo di difetto osseo presente. Sarà quindi possibile eseguire una chirurgia rigenerativa (seconda fase) per colmare la mancanza di osso attraverso l'inserimento di materiali autologhi o alloplastici di solito stabilizzati da una membrana.

Nel caso invece di una perdita ossea prevalentemente orizzontale e diffusa si procederà con una chirurgia di tipo osteo-resettiva, volta ad eliminare le tasche parodontali ancora fonti di possibili infezioni, modificando il profilo dell'osso circostante gli elementi dentali, con uno spostamento apicale della gengiva che consentirà al paziente di mantenere nel futuro un'ottima igiene orale e di salvare gli elementi dentali altrimenti irrimediabilmente compromessi. (72, 75, 78)

Parodontiti e malattie sistemiche

Diversi sono gli studi clinici e sperimentali pubblicati che hanno messo in evidenza una stretta correlazione tra le parodontiti ed alcune malattie sistemiche, in particolare malattie cardiovascolari, diabete e patologie polmonari; anche per alcune complicanze ostetriche, come la nascita di bambini pretermine sottopeso, sono state dimostrate possibili correlazioni con la presenza di parodontite.

Questi studi ipotizzano che le malattie parodontali possono avere effetti sistemici diretti attraverso la disseminazione per via ematica di batteri patogeni, o effetti sistemici indiretti, attraverso il ruolo negativo esercitato dalla infiammazione sistemica.

È importante sottolineare che sia le parodontiti che le malattie sistemiche correlate rappresentano fenomeni patologici la cui eziopatogenesi è multifattoriale, condividendo numerosi fattori di rischio legati agli stili di vita (ad esempio il fumo) oppure legati al patrimonio genetico (maggiore suscettibilità a contrarre o sviluppare una determinata malattia).

Numerosi studi scientifici hanno esaminato il rapporto tra il diabete e la malattia parodontale, evidenziando come la parodontite sia la sesta complicanza legata al diabete dopo la neuropatia, la nefropatia, la retinopatia e le malattie micro e macrovascolari. Il termine diabete mellito descrive un gruppo di malattie caratterizzate da livelli elevati di glucosio nel sangue e anomalie del

metabolismo di carboidrati, grassi e proteine. La concentrazione del glucosio risulta aumentata in tutti i fluidi fisiologici, compresa l'urina e la saliva. La disponibilità di zucchero nel fluido presente nelle tasche parodontali, anche in presenza di un perfetto regime di igiene orale e professionale, facilita notevolmente la moltiplicazione batterica negli intervalli tra un pasto e il successivo. È stato dimostrato che la relazione tra le due patologie è di natura bidirezionale, in quanto la parodontite non trattata porta ad una maggiore difficoltà del controllo metabolico nel paziente diabetico. Da un lato, quindi, il diabete peggiora la parodontite, dall'altro, quest'ultima rende più instabile il diabete. (81, 82)

È stato dimostrato che i batteri parodonto-patogeni sono direttamente coinvolti nello sviluppo delle malattie cardiovascolari. Il perché è facilmente intuibile, se si pensa che le forme avanzate di parodontite, con presenza di suppurazione, danno sempre batteriemia. L'ingresso dei microrganismi in circolo, consente loro di spostarsi facilmente, colonizzando altre strutture anatomiche, anche molto distanti dalla bocca. Numerosi studi effettuati su tessuti sclerotizzati, rimossi chirurgicamente ed analizzati con le più moderne tecniche biomolecolari, hanno evidenziato la presenza dei medesimi batteri delle tasche gengivali. I batteri, veicolati dal sangue, sfruttano l'abilità che hanno di penetrare nei tessuti parodontali per attraversare l'intima delle arterie e riprodurre la stessa infiammazione della parodontite nelle pareti delle stesse.

Inoltre, i pazienti affetti da parodontite aggressiva hanno parametri molto alti di proteina C reattiva e IL-6 (Interleuchina 6) nel plasma, che incrementano il rischio di problemi cardiovascolari e deregolazione del glucosio in soggetti anche giovani.

Vari studi hanno riportato che le persone affette da malattie cardiache hanno da 1,5 a 4 volte più probabilità di contrarre malattia parodontale, e che, i malati parodontali, hanno da 1,5 a 2,5 volte più probabilità di sviluppare complicanze aterosclerotiche e cardiovascolari. (83, 84)

Parodontite e parto pretermine

Recenti studi hanno evidenziato una correlazione tra la presenza di parodontopatia in gravidanza e parti prematuri (prima della 37° settimana) con basso peso del neonato (meno di 2,5 kg). Benché non sia ancora del tutto chiaro il meccanismo che associa le due condizioni, poiché è noto che una delle cause di parti prematuri è la presenza di infezioni, si suppone che i batteri implicati nella parodontite possano raggiungere per via ematica l'utero, oppure che l'infezione parodontale possa portare ad un incremento dei livelli ematici di citochine pro-infiammatorie tale da provocare modificazioni a livello intrauterino. (47, 85, 86, 87)

Risulta quindi evidente che mantenere buone condizioni orali è importante sia per la salute della mamma che per quella del nascituro.

Parodontite e fumo

Oltre agli studi sulle cause infettive, molto interessanti si sono rivelate le ricerche sulla correlazione tra il fumo e la parodontite, in particolare quelle correlate ai polimorfismi dei livelli genetici di Interleuchina 1 (IL-1), proteina deputata alla regolazione della risposta antiinfiammatoria dell'organismo. (88, 89)

In letteratura è riportato che il fumo costituisce un fattore di rischio sia di parodontite cronica e aggressiva, che di parodontite refrattaria alla terapia. Esso aumenta il rischio da 2,5 a 7,3 volte e la risposta alle terapie è minore nei fumatori, dato che, oltre a promuovere la crescita dei patogeni, incide sulla risposta dell'ospite e, in particolare, sulla regolazione proteolitica. Dopo aver controllato altre variabili, quali le differenti abitudini d'igiene orale, l'età, il sesso e le condizioni socio-economiche del paziente, i fumatori mostrano tasche ancora più profonde, maggiore perdita ossea, maggiore mobilità dentale e maggiore perdita di elementi dentari rispetto ai non fumatori.

Uno studio condotto per ben 10 anni, ha determinato che le condizioni parodontali del fumatore sono almeno quindici anni più avanzate dello stato parodontale dei non fumatori della stessa età anagrafica. Anche in individui al di sotto dei 40 anni di età, i fumatori mostrano parodontite e perdita di denti con incidenza doppia rispetto ai non fumatori. (90)

Per quanto riguarda la risposta dell'ospite all'insulto chirurgico o batterico, esistono forti evidenze di come l'effetto vasocostrittore della nicotina ostacoli la rivascolarizzazione dell'osso e dei tessuti molli, evento che può avere un notevole impatto negativo sulla guarigione delle ferite, specialmente dopo chirurgia resettiva, rigenerativa, muco-gengivale e implantare. È stato dimostrato come la nicotina assorbita fumando una sigaretta possa produrre un effetto di vasocostrizione periferica rilevabile (flusso sanguigno ridotto del 40%) della durata di 30-50 minuti. Pertanto, i fumatori pack-per-day sviluppano un'ipossia tissutale per un considerevole numero di ore ogni giorno. (91, 92)

Parodontopatie: gengivite propriamente detta e gengivite desquamativa

Per gengivite si intende l'infiammazione dei tessuti gengivali, caratterizzata da sanguinamento, gonfiore, arrossamento e calore, conseguenti all'accumulo di placca.

Diversi studi hanno dimostrato l'importanza dei livelli degli ormoni sessuali femminili, che possono favorire e soprattutto esacerbare certe forme di gengivite durante la pubertà, il ciclo mestruale, la gravidanza e la menopausa.

La gengivite desquamativa non è una singola e ben inquadrata malattia, ma un quadro clinico caratterizzato da eritema, erosione, bolle e desquamazione della gengiva libera e di quella aderente. È caratterizzata da tessuto gengivale rosso scuro, dolente e facilmente sanguinante. La desquamazione può essere preceduta dalla formazione di vescicole. Questa condizione spesso si verifica durante la menopausa e può, in questo caso, rivelarsi efficace per la sua cura la somministrazione sequenziale di estrogeni e progestinici. Una lesione gengivale simile può essere dovuta a pemfigo volgare, pemfigoide bolloso, pemfigoide mucoso benigno o lichen planus atrofico e risponde alla terapia con corticosteroidi. (36, 39, 44)

Stomatopirosi

La stomatopirosi o sindrome della bocca urente (dall'inglese "burning mouth syndrome") è una malattia tipica del sesso femminile, in particolare nel periodo della menopausa. La caratteristica principale delle pazienti che ne sono affette è il bruciore orale diffuso, in assenza di altre lesioni alle mucose. È spesso accompagnata da altri sintomi orali, quali xerostomia e disgeusia.

Il bruciore colpisce la lingua (soprattutto il dorso e la punta), il palato, le labbra, le superfici mucose in rapporto con protesi mobili e, più raramente, il pavimento della bocca. Nella maggior parte dei casi, il bruciore è generalizzato a tutta la mucosa orale.

Per definizione, la stomatopirosi rimane una condizione clinica in cui non è possibile identificare con certezza le cause e quindi l'eziologia rimane idiopatica fino alla realizzazione di ulteriori studi in materia. Le tre teorie eziologiche principali per questa patologia sono: alterazioni ormonali, neuropatie periferiche e disordini psicosomatici. Nella pratica clinica si distinguono quindi casi di bruciore orale in cui è possibile risalire a fattori causali ben conosciuti e identificabili e casi in cui il bruciore orale non è riconducibile ad alcun fattore noto.

Ad oggi, la stomatopirosi è considerata una condizione patologica che coinvolge un meccanismo neuropatico e si osserva di frequente in associazione a disordini di origine psicosomatica. Questi pazienti hanno una personalità ansiosa, introversa, tendente alla depressione, all'ipocondria e allo stress. Questi disturbi della personalità si riscontrano nelle pazienti in menopausa e vengono aggravati dalla percezione della perdita della propria identità femminile. Pertanto, è stato a lungo studiato il legame con il deficit estrogenico.

In alcune pazienti è stata osservata un'associazione tra variazioni degli ormoni estrogeni, alterata funzione delle ghiandole salivari con modificazioni qualitative e quantitative della saliva e presenza di bruciore orale.

Tra le cause della stomatopirosi secondaria figurano fattori locali, come malattie immunitarie, infezioni, xerostomia, lingua a carta geografica e molte altre.

Non esiste un trattamento specifico e risolutivo della stomatopirosi. Molti farmaci sono stati impiegati, ma spesso in maniera del tutto empirica e con risultati variabili. Gli antistaminici e gli anestetici locali possono essere di aiuto a calmare almeno temporaneamente il bruciore. Utile è talvolta la somministrazione di farmaci a scopo di placebo. Nelle forme su base psicosomatica, l'approccio alla paziente, prima ancora che farmacologico, deve essere di tipo psicologico. (93, 94)

Xerostomia

La xerostomia è una condizione patologica che comporta una scarsa e alterata secrezione salivare, ed è diffusa particolarmente tra le persone anziane, prevalentemente donne, delle quali il 70% in menopausa.

Le cause più importanti di xerostomia permanente sono le seguenti:

- irradiazione della testa e del collo per la cura di neoplasie;
- rimozione chirurgica delle ghiandole salivari;
- sindrome di Sjogren (malattia autoimmune che determina la distruzione delle ghiandole salivari e lacrimali);
- xerostomia indotta da farmaci.

Alla xerostomia si possono associare la carie del colletto dentale e le infezioni micotiche, i problemi a portare la protesi degli elementi dentari mancanti e la difficoltà ad alimentarsi. Inoltre la diminuzione della saliva comporta la presenza di una spessa placca batterica e un accumulo di detriti che possono portare a un aumento delle infezioni parodontali.

La xerostomia viene trattata con pilocarpina, che agisce aumentando la produzione di saliva, o migliorata dall'applicazione topica di sostituti della saliva (lisozima, lattoferrina e lattoperossidasi). Inoltre, negli ultimi anni, è stata trattata con buoni risultati mediante elettrostimolazione del nervo linguale. (95, 96, 97)

AGENTI EZIOLOGICI E PATOGENESI DELLA PARODONTITE

Come detto in precedenza, la parodontite è una patologia infettiva causata dai batteri che costituiscono la placca. Tuttavia, delle oltre 400 specie batteriche che la compongono, solo una sottopopolazione è implicata nell'eziopatogenesi delle parodontopatie e può causare, in soggetti con predisposizione genetica (familiarità) o fattori di rischio, l'insorgere della malattia. Numerosi studi indicano, infatti, che la distribuzione e la prevalenza dei patogeni parodontali variano nelle diverse zone geografiche, nonché tra etnie.

I microrganismi orali responsabili del processo patogenetico, pur appartenendo a specie diverse, hanno la caratteristica comune di essere prevalentemente anaerobi, adatti a sopravvivere all'ambiente ipossico delle tasche dentali, e di presentare diversi determinanti di patogenicità (enzimi proteolitici, leucotossine). (98, 99)

Un tentativo di classificazione dei patogeni parodontali basato sul criterio di associazione con la malattia parodontale è stato pubblicato da Socransky che propose un'analisi delle variazioni quantitative di 40 specie batteriche, valutandole in campioni di pazienti sani e affetti da parodontite di vario grado, mediante l'utilizzo dell'ibridizzazione *in situ* del DNA del campione con sonde oligonucleotidiche radioattive. I dati ottenuti hanno permesso la suddivisione delle varie specie batteriche in cinque raggruppamenti ("complex"), in base all'associazione con la gravità clinica della malattia parodontale. (100)

Successivamente altri autori hanno valutato la classificazione proposta da Socransky tramite studi orizzontali e longitudinali su pazienti provenienti da differenti regioni geografiche e con abitudini di vita molto differenti, utilizzando sistemi di rilevamento più sensibili e in grado di rilevare variazioni clonali nell'ambito della stessa specie. (101, 102)

Le specie batteriche che si ritiene siano maggiormente implicate nella parodontite, tutte anaerobie e gram-negative, sono le seguenti: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*,

Fusobacterium nucleatum, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*. Vari studi epidemiologici confermano l'associazione tra questi batteri e la malattia parodontale, in quanto tali specie sono riscontrate più frequentemente, e ad elevati livelli, in soggetti con parodontiti che non in soggetti sani o in soggetti con gengiviti. (74, 103, 104, 105)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans è un batterio di forma bastoncellare, Gram-negativo, anaerobio facoltativo, immobile; è stato dimostrato che questa specie ha un ruolo fondamentale nell'insorgenza della parodontite aggressiva. Peraltro, è possibile ritrovare questo microrganismo sia in soggetti sani che in siti tissutali sani di soggetti malati, sebbene con una frequenza di isolamento e con una carica molto più bassa rispetto ai siti tissutali malati. Tra i ceppi di *A. actinomycetemcomitans* sono state riscontrate anche variazioni fenotipiche, che possono giustificare differenze nella patogenesi. Ad oggi, sono stati identificati cinque distinti sierotipi di *A. actinomycetemcomitans* (sierotipi da *a* fino ad *e*); tra essi il sierotipo *b* è quello più frequentemente associato ai siti malati. La colonizzazione da parte di ceppi produttori di elevate quantità di leucotossina è stata correlata, inoltre, all'insorgenza della parodontite sia cronica che aggressiva.

Porphyromonas gingivalis è un bastoncello Gram-negativo, anaerobio, immobile. Tra le specie batteriche sospettate di essere patogene per il parodonto, esso è quello che più frequentemente è associato alla parodontite cronica. Il ritrovamento di *P. gingivalis* è indice di rischio elevato di progressione della malattia e trattamenti terapeutici efficaci della parodontite cronica correlano con livelli di carica batterica più bassi. Questa specie può essere isolata anche nei siti sani (circa il 25% dei casi) anche se nei siti malati può essere isolata in maggiore frequenza ed in carica più elevata rispetto ai siti sani o ai siti con una recente insorgenza della malattia. La risposta dell'ospite verso *P. gingivalis* si manifesta con un consistente aumento del titolo anticorpale in soggetti con parodontite

cronica. E' stato osservato un certo grado di variabilità tra i vari ceppi di *P. gingivalis* sulla base delle analisi di particolari sequenze di DNA cromosomico e alcuni di questi ceppi sono molto più frequentemente associati con la malattia nell'uomo. *P. gingivalis* possiede numerose proprietà che possono contribuire alla sua virulenza, come la sintesi di proteasi, che sono in grado di degradare sia molecole effettrici della risposta immunitaria, sia molte molecole tissutali dell'ospite, fondamentali per il supporto parodontale del dente.

Le spirochete del cavo orale sono batteri Gram-negativi, anaerobi, spiraliformi e dotate di un elevato grado di mobilità. Le spirochete sono state associate con le parodontiti, ma è stato storicamente molto difficile studiarle a causa della incapacità di coltivare molti di questi microrganismi e di caratterizzarli a livello di specie nei campioni clinici. Studi effettuati su spirochete del cavo orale, utilizzando metodi molecolari, indicano che circa 3/4 delle specie di spirochete orali, appartenenti al gene *Treponema*, ad oggi non sono state ancora coltivate. Osservazioni microscopiche di biopsie gengivali indicano che microrganismi spiraliformi sono associati a parodontiti ed a siti tissutali che evidenziano un recente riassorbimento osseo; è stato descritto, inoltre, che spirochete possono essere ritrovate nei tessuti di pazienti con parodontite aggressiva e cronica avanzate. Il numero di tali microrganismi è correlato con la gravità della parodontite cronica o aggressiva e la carica batterica diminuisce con il trattamento terapeutico. Analogamente ad altre specie patogene per il parodonto, spirochete sono state ritrovate in basso numero in siti parodontali sani. Le due specie che sono state associate a parodontiti sono *Treponema denticola* e *Treponema lecithinolyticum*.

Un'altra specie batterica presente nel cavo orale che è stata associata alle malattie parodontali è *Tannerella forsythia*. Essa è stata ritrovata in carica più elevata in siti tissutali malati rispetto a siti sani e un decremento nel numero di tali batteri si correla con una evoluzione benigna della malattia. E' stato

osservato che la presenza di *T. forsythia* è predittiva di un futuro danno dei tessuti del parodonto.

I batteri parodontopatogeni possiedono o producono numerosi fattori che favoriscono il danneggiamento dei tessuti del parodonto (endotossina, esoenzimi e prodotti a basso peso molecolare del metabolismo batterico). La produzione di esotossine non è frequente, tuttavia, come detto, è stata descritta una leucotossina prodotta da *A. actinomycetemcomitans* che può certamente favorire la distruzione dei leucociti presenti nel fluido crevicolare facilitando la colonizzazione batterica. *P. gingivalis* e alcuni ceppi di *A. actinomycetemcomitans* producono grandi quantità di collagenasi che, probabilmente, riveste un ruolo essenziale nella distruzione della componente connettivale del parodonto. Altri esoenzimi prodotti dai batteri parodontopatogeni (gelatinasi, aminopeptidasi, fosfolipasi A, fosfatasi alcaline e acide, cheratinasi, neuraminidasi, ecc.) sono anch'essi sicuramente coinvolti nella patogenesi delle lesioni. Alcuni batteri presenti nelle lesioni sottogengivali, inoltre, possono indurre un'attivazione policlonale dei linfociti B, causare una disregolazione nella produzione di citochine infiammatorie, ed è possibile che alcuni componenti batterici abbiano i caratteri di superantigeni. Le lesioni causate dai prodotti del metabolismo batterico, sono, a loro volta, complicate dall'insorgere di una intensa reazione immune umorale e cellulo-mediata, con una forte stimolazione alla produzione di linfociti T citotossici.

Benchè le specie batteriche associate a parodontiti siano prevalentemente Gram-negative, anche alcune specie Gram-positive come *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* ed *Eubacterium nodatum* sembrano coinvolte in tali malattie. Studi recenti hanno dimostrato anche un'associazione tra virus erpetici (Epstein-Barr di tipo 1 e Citomegalovirus dell'uomo) e parodontiti croniche e la presenza di questi virus nei siti sub gengivali è spesso associata ad elevati livelli di putative specie batteriche patogene come *P. gingivalis*, *T.*

denticola e *T. forsythia*. Il potenziale ruolo di tali virus nella patogenesi della malattia parodontale rimane, tuttavia, ancora poco chiaro.

In linea di massima, le lesioni infiammatorie del parodonto hanno la tendenza, in assenza di adeguati interventi terapeutici nella fase iniziale e nei soggetti con fattori predisponenti (cattiva igiene orale, tabagismo, diabete, stato di stress, allergia, osteoporosi, deficit nell'attività dei polimorfonucleati, ecc.), a cronicizzare. Questi fattori, tuttavia, rimangono concause di un processo patogenetico che vede nell'acquisizione di specifici agenti eziologici batterici il fattore determinante di un'infezione, che può portare alla comparsa di estesi fatti distruttivi dei tessuti di supporto del dente e delle relative strutture di ancoraggio, con la conseguente perdita di porzioni di dentatura più o meno estese. (37, 78)

Diversi metodi sono stati usati per individuare singolarmente i patogeni responsabili della malattia parodontale e la loro coesistenza nella malattia parodontale in relazione allo stato della malattia. Il metodo colturale rappresenta sicuramente il “gold standard” per caratterizzare la popolazione microbica ed è anche l'unico sistema per valutare la sensibilità *in vitro* agli antimicrobici. Nonostante ciò, la difficoltà riscontrata nell'utilizzo dell'indagine colturale per l'identificazione di alcune specie batteriche particolarmente difficili da coltivare opportunamente, ha reso necessaria l'introduzione di nuovi approcci metodologici più sensibili e specifici, quali test immunologici, e metodi molecolari come la reazione a catena della polimerasi (“Polymerase Chain Reaction”, PCR). (98, 99, 106)

PARODONTITE, MENOPAUSA E TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

Le donne in stato di menopausa sono certamente suscettibili alla malattia parodontale e gli ormoni sessuali giocano un ruolo significativo nel predisporre la cavità orale all'instaurarsi di tale patologia. (30, 35, 36, 38, 39). Gli studi condotti finora riguardanti lo stato di salute orale delle donne in menopausa riportano, anche se con pareri discordanti, che l'utilizzo della TOS, oltre ad intervenire sul trattamento dei sintomi vasomotori (vampate di calore), per la secchezza vaginale e l'atrofia e per la prevenzione dell'osteoporosi e delle fratture ad essa correlate e quindi migliorare la qualità della vita, è associato a una riduzione della sintomatologia orale (dolori diffusi, infiammazione gengivale, *burning mouth syndrome*, disgeusia, etc.) riferita dalle pazienti all'anamnesi durante la visita odontoiatrica. (107, 108)

Altri studi affermano, invece, che la somministrazione della TOS in menopausa contribuisca soltanto a un miglioramento della mobilità dentale, in particolare nelle pazienti affetti da mobilità dentale di I e II grado, ritardando in tal modo la perdita dei elementi dentari. Purtroppo a causa dell'assenza di dati completi, ulteriori studi occorrono per poter affermare questo con certezza. (109, 110)

Gli studi riguardanti gli effetti del microbiota orale sulle donne in menopausa sono scarsi (35, 111, 112) Tuttavia, il ruolo degli ormoni sessuali femminili, come già accennato, è stato considerato a lungo influente sui tessuti parodontali e sulla progressione della malattia parodontale.

OBIETTIVI DELLA RICERCA

Attualmente il sistema più appropriato per arrestare la progressione della malattia parodontale riguarda il controllo effettivo dei microrganismi che compongono la placca batterica. Una migliore conoscenza della composizione della placca sottogengivale e la correlazione tra patogeni parodontali e lo stato della malattia nelle donne in menopausa sono pertanto cruciali per impostare un trattamento corretto.

A tal scopo, con questo studio si è cercato di valutare quali fossero le implicazioni della menopausa sulla salute orale e di confrontare le pazienti in trattamento con TOS con quelle non in terapia. Per raggiungere tali obiettivi sono state valutate le variazioni negli indici clinici parodontali (BOP, PI, PPD, REC, MOB) e nella presenza delle specie batteriche più frequentemente coinvolte nell'eziopatogenesi delle parodontopatie (quali *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*), con follow up a due anni, in pazienti sia in TOS che non in terapia.

Inoltre, in ciascun gruppo di soggetti arruolati sono state esaminate eventuali differenze in relazione anche ad altri fattori, quali osteoporosi, obesità, diabete, tabagismo, attività fisica, che consentirebbero di monitorare il rischio soggettivo di andare incontro a patologie orali invalidanti o a patologie a carico del sistema cardiocircolatorio, riferite in netto aumento nella donna in perimenopausa.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Nel 2011 sono state reclutate 65 pazienti in menopausa clinicamente accertata (età media 59 anni), affette da parodontite cronica, tra quelle afferenti alla Clinica Ostetrica e Ginecologica del presidio “Gaspere Rodolico” dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria “Policlinico-Vittorio Emanuele” di Catania.

Le pazienti, che sono state esaminate in conformità ai principi etici riportati nella Dichiarazione di Helsinki e dopo aver ottenuto il consenso informato, sono state scelte utilizzando i seguenti criteri di esclusione: antibiotico-terapia e terapia parodontale in corso o terminata da meno di 15 giorni, presenza di un numero di denti inferiore a 20, assenza di malattie sistemiche, utilizzo di collutori nell'ultima settimana. Su tali pazienti sono stati valutati i livelli ormonali, la densità ossea attraverso la mineralometria ossea computerizzata (MOC) e le condizioni di igiene orale mediante la visita e la compilazione di uno specifico questionario anamnestico (ultima visita odontoiatrica effettuata, trattamenti odontoiatrici subiti nel corso degli anni, ecc.), e sono stati eseguiti 4 prelievi di placca subgengivale.

A distanza di circa 2 anni è stato eseguito il *follow up* delle 34 pazienti (15 in TOS, 19 non in terapia) che hanno manifestato il consenso ad una nuova valutazione delle proprie condizioni di igiene orale, e ad una seconda serie di prelievi.

Esame clinico odontoiatrico

Visita odontoiatrica

Le pazienti sono state sottoposte ad una visita odontoiatrica nel corso della quale sono stati valutati i parametri routinariamente utilizzati per la stadiazione dell'eventuale malattia parodontale mediante l'utilizzo di una sonda parodontale. I parametri sono i seguenti:

- sanguinamento al sondaggio (“Bleeding On Probing”, BOP);
- indice di placca (“Plaque Index”, PI);
- profondità della tasca parodontale (“Probing Pocket Depth”, PPD);
- recessione gengivale (“Gingival Recession”, REC);
- mobilità degli elementi dentali (“Mobility”, MOB);

e l'eventuale presenza di essudato.

Per la misurazione degli indici parodontali è stata utilizzata una sonda parodontale millimetrata manuale di Williams da 15 mm (Asa Dental, Italia).

Il BOP è stato misurato, per valutare la tendenza al sanguinamento dei tessuti molli, effettuando il sondaggio su sei siti (MV mesio-vestibolare, V vestibolare, DV disto-vestibolare, ML mesio-linguale, L linguale, DL disto-linguale).

Durante la registrazione del PI vengono esaminate le quattro superfici dentarie (mesiale, distale, vestibolare, linguale/palatale) dei denti in arcata, per la valutazione della compliance del paziente e delle condizioni dei tessuti parodontali superficiali pre e post trattamento. In seguito all'applicazione di un agente rivelatore di placca, viene valutata la presenza o assenza della stessa al margine gengivale, e per ogni zona esaminata viene attribuito un punteggio variabile da 0 a 3, dove 0 indica l'assenza di placca, 1 indica la presenza di placca non visibile ma rilevabile tramite inserimento della sonda nel solco, 2 indica la presenza di placca visibile e, infine, 3 indica l'abbondanza di placca. Il

PI viene calcolato con la formula: (numero superfici con placca/numero dei denti esaminati x 4) x 100 = % PI.

La PPD si misura rilevando determinati valori nei 6 siti (MV mesio-vestibolare, V vestibolare, DV disto-vestibolare, ML mesio-linguale, L linguale, DL disto-linguale) dove viene registrato il sanguinamento al sondaggio.

La REC si misura dalla giunzione amelo-cementizia (giunzione fra lo smalto della corona ed il cemento della radice di un dente) al margine gengivale libero e si controlla nel tempo.

Il CAL misura la distanza tra la giunzione amelo-cementizia e il punto più apicale di penetrazione della sonda, e viene calcolato con la formula: PPD+REC.

L'indice di MOB va da 1 a 3 a seconda che il dente sia mobile in direzione orizzontale per valori compresi tra 0,2-1 mm (grado 1), o per più di 1 mm (grado 2), o che sia mobile anche in direzione verticale (grado 3).

Modalità di prelievo e trasporto dei campioni

Dopo aver valutato i parametri suddetti e rimosso la placca sopragengivale, i siti che si intendeva misurare sono stati isolati mediante rulli di cotone e asciugati con aria. Successivamente, mediante l'utilizzo di coni di carta ("paper point"), sono stati eseguiti 4 prelievi di placca subgengivale (uno per quadrante) dalla tasca profonda, in prossimità del 1° e 2° molare.

I coni di carta sterili (misura ISO #40, Meta Biomed) sono stati prelevati con pinza sterile dalla confezione e inseriti nella tasca parodontale per 20 secondi senza farli entrare in contatto con la mucosa o con la saliva. Dopodiché sono stati rimossi, uno alla volta, e inseriti in apposite provette sterili (Eppendorf), contenenti Tris-EDTA. (5, 35, 38, 39, 44)

I campioni sono stati immediatamente posti all'interno di una borsa frigo refrigerata, e, successivamente, trasportati nel più breve tempo possibile nella sede della sperimentazione microbiologica, dove sono stati posti in congelatore.

Esame microbiologico: analisi molecolare dei campioni

La sperimentazione microbiologica è stata eseguita presso il laboratorio di microbiologia del Dipartimento di Scienze Bio-Mediche, Sez. di Microbiologia, dell'Università degli Studi di Catania, dove, dopo aver estratto il DNA dai campioni pervenuti e dai ceppi standard delle 12 specie batteriche patogene oggetto dello studio, mediante l'impiego di tecniche di biologia molecolare è stato valutato quali di esse fossero presenti nei singoli pazienti, alla “baseline” e al “follow up”.

Ceppi batterici

In questo studio, sono stati utilizzati i seguenti ceppi standard: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522, *Campylobacter rectus* ATCC 33238, *Eikenella corrodens* ATCC 23834, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406, *Prevotella intermedia* ATCC 49046, *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563, *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Treponema denticola* ATCC 35405 e *Veillonella parvula* ATCC 10790.

Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA dai campioni di placca subgingivale e dai ceppi standard delle specie oggetto dello studio è stato utilizzato il “DNeasy Blood and Tissue Kit”, contenente, oltre ai numerosi buffer richiesti (ATL, AL, AE, AW1 e AW2), le “DNeasy Mini spin column”, e sono stati seguiti, sebbene apportando alcune modifiche, il protocollo di pretrattamento per batteri gram-negativi, e il protocollo di purificazione del DNA totale da tessuti animali [DNeasy® Blood & Tissue Handbook - “Pretreatment protocol for Gram-

Negative Bacteria” (pag. 44); “Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)” (pagg. 29-30)].

Innanzitutto, le provette Eppendorf contenenti i campioni di placca subgengivale (4 per paziente) sono state centrifugate per 10 minuti a 12.000 x g in una microcentrifuga (5415R, Eppendorf) per far sedimentare le cellule.

Dopo aver eliminato il sovranatante, in una delle 4 provette utilizzate per ogni paziente sono stati aggiunti 180 µl di Buffer ATL (“animal tissue lysis”), contenente acido edetico e sodio dodecil solfato (SDS), che sono stati utilizzati per raccogliere il pellet cellulare delle 4 provette in un'unica provetta, così da avere una provetta per paziente. Nel caso dei ceppi standard delle 12 specie esaminate in questo studio, giacchè erano tutti conservati in crio-vial, l'unica differenza nella procedura è consistita nel fatto che non è stato necessario riunire il pellet cellulare in unica provetta, in quanto se ne è utilizzata una per ceppo fin dall'inizio.

Dopo aver aggiunto 20 µl di proteinasi K alla sospensione, la miscela è stata vortexata energicamente ed incubata (in bagnomaria e sotto agitazione) a 56°C per circa 1 ora, così da ottenere la lisi completa delle cellule batteriche.

Rimossa la provetta dal bagnomaria, al campione sono stati aggiunti 200 µl di Buffer AL (“animal lysis”), contenente guanidina cloruro e un detergente, e la miscela è stata vortexata energicamente. Immediatamente dopo, sono stati aggiunti 200 µl di etanolo (96%), e la miscela è stata nuovamente vortexata energicamente per alcuni secondi.

A questo punto, la miscela è stata immessa, mediante una pipetta, all'interno della “DNeasy Mini spin column”, posta a sua volta in una provetta di raccolta da 2 ml. Dopo aver centrifugato la miscela a 8.000 x g per 1 minuto, la provetta, contenente il liquido non trattenuto dalla colonna, è stata eliminata.

Posta la “DNeasy Mini spin column” in un'altra provetta di raccolta da 2 ml, sono stati aggiunti 500 µl di Buffer AW1 (“animal washing 1”), contenente

etanolo e una bassa concentrazione di guanidina cloruro. Dopo aver centrifugato la miscela nuovamente a 8.000 x g per 1 minuto, la provetta è stata eliminata.

A questo punto la “DNeasy Mini spin column” è stata posta in un'altra provetta di raccolta da 2 ml, e le sono stati aggiunti 500 µl di Buffer AW2 (“animal washing 2”), contenente Tris e un'alta concentrazione di etanolo (70%). Dopo aver centrifugato la miscela a 16.000 x g per 3 minuti per asciugare la membrana della colonna, anche questa provetta è stata eliminata.

Posta la “DNeasy Mini spin column” in una provetta Eppendorf sterile da 1,5 o 2 ml, sono stati aggiunti 200 µl di Buffer AE (“animal elution”), a pH 9 e contenente 10 mM Tris-HCl e 0,5 mM EDTA. Dopo aver incubato a temperatura ambiente per circa 1 minuto, la provetta è stata centrifugata per 1 minuto a 8.000 x g .

Infine, la provetta sterile contenente l'eluato, ossia il DNA estratto, è stata posta a 4°C (frigorifero) o a -20°C (congelatore), in funzione di quanto a lungo il DNA andava conservato prima di essere utilizzato nei successivi esperimenti.

PCR

Ultimata l'estrazione del DNA da tutti i campioni di placca subgengivale e dai ceppi standard, si è dato inizio ai saggi basati sulla tecnica della PCR, volti alla rilevazione della presenza di sequenze conservate della porzione 16S del rRNA di 12 tra le specie batteriche più frequentemente responsabili di parodontopatie. Le specie oggetto della sperimentazione sono state le seguenti: *A. actinomycetemcomitans* (AA), *C. rectus* (CR), *E. corrodens* (EC), *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* (che d'ora in poi, per brevità, verrà chiamato solo *F. nucleatum*) (FN), *P. endodontalis* (PE), *P. gingivalis* (PG), *P. intermedia* (PI), *P. melaninogenica* (PM), *P. nigrescens* (PN), *T. forsythia* (TF), *T. denticola* (TD) e *V. parvula* (VP).

Innanzitutto, per individuare le condizioni operative ottimali, sono state eseguite delle PCR preliminari con i suddetti ceppi standard, utilizzando primer riportati in letteratura. (107-116) Tali PCR hanno consentito, non solo di stabilire le temperature e i tempi di denaturazione, appaiamento o “annealing” ed estensione ai quali le coppie di primer avevano il miglior rendimento (annealing in Tabella A), ma anche, mediante delle verifiche incrociate tra ceppi di specie differenti, quanto i primer fossero specie-specifici. A tal proposito, va detto, che di alcune specie sono state testate più coppie di primer, ma che, in Tabella A sono riportate solo le coppie utilizzate per i saggi veri e propri sui campioni. Inoltre, va anche precisato che la temperatura di appaiamento riportata nella Tabella, che è quella che è stata effettivamente utilizzata, coincide con quella riportata nei lavori da cui sono state tratte le sequenze dei primer (cui si fa riferimento nell'ultima colonna della tabella) solo in alcuni casi. Inoltre, sebbene in alcuni dei suddetti lavori si faccia riferimento all'impiego della multiplex PCR, tecnica che, mediante l'utilizzo contemporaneo di più coppie di primer, consente di ricercare la presenza di sequenze appartenenti a 2 o più specie batteriche differenti allo stesso tempo, in nessun caso, nel nostro studio, è stata utilizzata tale tecnica. Questo perchè, i test preliminari ci hanno anche consentito di riscontrare che la sensibilità della simplex PCR era sempre superiore a quella della multiplex.

Definite le condizioni operative, si è proceduto con i saggi veri e propri sui campioni da esaminare, che, laddove necessario, sono stati eseguiti più volte. Per quanto riguarda la PCR, il procedimento è consistito innanzitutto nella preparazione, in provette Eppendorf da 0,2 ml, di un miscuglio di reazione del volume di 25 µl contenente i seguenti componenti: 3 µl del DNA estratto, 0,5 µl della coppia di primer (0,25 µl ciascuno), 0,5 µl della miscela di deossinucleosidi trifosfato (contenente dATP 2 mM, dCTP 2 mM, dTTP 2 mM e dGTP 2 mM), 2,5 µl di una soluzione tampone specifica (priva di MgCl₂) 10x, 2 µl di MgCl₂ 25 mM, 0,125 µl (pari a 0,75 unità) di DNA Taq polimerasi (Sigma-Aldrich) e acqua sterile e priva di . Ogni miscuglio di reazione è stato quindi

posto in un termociclatore (MultiGene™ Mini, LabNet), una macchina termostatica che automaticamente compie cicli di temperatura programmati, nel quale hanno avuto luogo le varie fasi del procedimento di amplificazione, che sono: riscaldamento a 94°C per 5 minuti; 30 cicli di denaturazione (del DNA) a 94°C per 30 secondi, di appaiamento (dei primer col DNA) a 55-59°C (a seconda della coppia di primer, Tabella A) per 1 minuto e di estensione (della catena di DNA) a 72°C per 1 minuto; un'estensione finale a 72°C per 5 minuti.

Tabella A. Primer e condizioni impiegati nella PCR per rilevare la presenza dei batteri oggetto dello studio.

Specie batterica	Sequenza primer senso ed antisenso	Temp. annealing	Lungh. Amplic.	Rif. Bibl.
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5'-AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC-3'	59°C	557 bp	113
	5'-ATGCCAACTTGACGTAAAT-3'			
<i>Campylobacter rectus</i>	5'-TTTCGGAGCGTAAACTCCTTTTC-3'	55°C	598 bp	113-115
	5'-TTTCTGCAAGCAGACACTCTTC-3'			
<i>Eikenella corrodens</i>	5'-CTAATACCGCATACGTCCTAAG-3'	57°C	688 bp	113-115 122
	5'-CTACTAAGCAATCAAGTTGCCC-3'			
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	55°C	407 bp	116 117
	5'-GTCATCGTGACACAGAATTGCTG-3'			
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	5'-CTATATTCTTCTTTCTCCGCATGGAGGAGG-3'	55°C	494 bp	118 120-121
	5'-GCATACCTTCGGTCTCCTCTAGCATAT-3'			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3'	57°C	404 bp	113-114 117-121
	5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'			
<i>Prevotella intermedia</i>	5'-CCCGATGTTGTCCACATATGG-3'	55°C	575 bp	113 119-120
	5'-GCATACGTTGCGTGCACTCAAG-3'			
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5'-CTACATTTACAACACACTTAATCT-3'	55°C	553 bp	119
	5'-AAACGGCATTGAGTGCTTGCACTCT-3'			
<i>Prevotella nigrescens</i>	5'-ATGAAACAAAGGTTTTCCGGTAAG-3'	55°C	804 bp	113 120
	5'-CCCACGTCTCTGTGGGCTGCGA-3'			
<i>Tannerella forsythensis</i>	5'-GCGTATGTAACCTGCCCCGA-3'	55°C	641 bp	113 114
	5'-TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3'			
<i>Treponema denticola</i>	5'-TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT-3'	55°C	316 bp	113-114 117
	5'-TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA-3'			
<i>Veillonella parvula</i>	5'-TGAAAGGTGGCCTCTATTTAT-3'	55°C	292 bp	122
	5'-CAATCCTTCTAACTGTTGCA-3'			

Al termine del saggio, che aveva, nel nostro caso, una durata di circa 1 ora e 50 minuti, le provette sono state poste a 4°C (frigorifero) o a -20°C

(congelatore), in funzione di quanto a lungo andavano conservate prima di procedere con la fase successiva, cioè l'elettroforesi su gel d'agarosio.

Elettroforesi su gel d'agarosio

Il gel di agarosio è uno strato orizzontale e rettangolare di agarosio che ha una matrice di pori attraverso cui il DNA, in presenza di un campo elettrico, passa, migrando in direzione del polo positivo. La preparazione del gel comporta le seguenti operazioni: innanzitutto, l'agarosio (opportunamente pesato per ottenere un gel all'1,2-1,5%) va solubilizzato a caldo in una soluzione di TAE (Tris-acetato EDTA) 1x; poi, la soluzione di agarosio va fatta raffreddare fino ad una temperatura di circa 60°C; a quel punto si aggiunge un agente intercalante del DNA, quale il SYBR Green I (1%); si versa la soluzione in uno stampo ("gel caster", Bio-Rad) e vi si inseriscono degli appositi pettini (1 o 2), con denti rettangolari, che consentono di produrre dei pozzetti separati (uno per ogni dente del pettine), che alloggeranno i diversi campioni; infine, si dà modo al gel di formarsi al meglio lasciandolo a temperatura ambiente per almeno 1 ora, o ponendolo in frigorifero per 40-50 minuti circa.

Una volta rimossi i pettini e posto il gel nella camera elettroforetica (Sub-Cell GT Cell, Bio-Rad), in ognuno dei pozzetti è stata aggiunta una miscela, consistente in un'aliquota, pari solitamente a 15 µl, del prodotto della PCR, e in un'altra aliquota, pari a 1/5 della precedente (quindi solitamente 3 µl), di "Gel loading solution" 6x. Quest'ultima, aumenta la densità dei campioni inoculati, e, contenendo blu di bromofenolo e/o xilene cianolo, che, in presenza di un campo elettrico danno luogo a delle bande, rispettivamente di colore blu e arancione, visibili a occhio nudo e che si spostano alla stessa velocità di frammenti di dimensioni note, consente di seguire l'andamento della corsa. Ultimato il riempimento dei pozzetti, la camera elettroforetica viene chiusa, gli elettrodi collegati all'alimentatore per elettroforesi, il voltaggio da applicare fissato, e si dà inizio alla corsa elettroforetica, che, nel nostro caso, è stata sempre interrotta

dopo circa 40 minuti. In questo sistema, i frammenti di DNA eventualmente presenti corrono contemporaneamente sul gel, ad una velocità inversamente proporzionale alle loro dimensioni.

Ma ciò che rende visibili le bande indicanti la presenza di frammenti formatisi durante i cicli di amplificazione della PCR, è il SYBR Green I precedentemente aggiunto, che rende il DNA visibile alla luce ultravioletta. Infatti, per conoscere l'esito finale del procedimento, è necessario che i campioni, contenenti i frammenti di DNA eventualmente amplificati, e un marker (100bp DNA Ladder), un campione contenente frammenti di dimensioni note, siano visualizzati mediante un transilluminatore UV (Vilber Lourmat), al fine di valutare, qualora siano presenti delle bande attribuibili ai pozzetti in cui sono stati inoculati i campioni, la distanza a cui ciascuna banda di DNA ha migrato dal pozzetto, ed individuare, quindi, se i frammenti sono delle dimensioni attese (Tabella A), e, conseguentemente, se il batterio in esame era presente nel campione subgengivale o no.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati riportati nella Tabella 1 riflettono principalmente le condizioni di salute orale delle 64 pazienti in menopausa arruolate per questo studio, di età compresa fra i 45 e gli 80 anni (età media 59 anni), e le loro condizioni cliniche. I suddetti dati sono stati rilevati durante le visite odontoiatriche, effettuate nel 2011 (baseline) e, per le 34 pazienti che hanno dato il consenso a proseguire lo studio, nel 2013 (follow up), e dalla cartella clinica ginecologica. Per quanto riguarda i dati odontoiatrici, alle pazienti è stato sottoposto un apposito questionario anamnestico, al fine di individuare informazioni riguardanti l'ultima visita odontoiatrica effettuata e i trattamenti odontoiatrici subiti nel corso degli anni. Inoltre, alla visita clinica sono stati accertati il numero di elementi dentari presenti e misurati i parametri clinici parodontali. I dati più significativi che sono emersi dall'analisi dei questionari odontoiatrici e ginecologici e delle cartelle cliniche delle pazienti verranno commentati successivamente. A differenza di quanto riportato in altre ricerche, nel nostro studio non è stato riscontrato alcun miglioramento della MOB.

I risultati ottenuti dall'analisi delle condizioni cliniche rilevate durante la visita ginecologica, al baseline e al follow up, sono riportati nella Tabella 2. La sintomatologia menopausale, comprendente le reazioni vasomotorie (vampate di calore, sudorazioni), insonnia, sbalzi d'umore, cambiamenti nella composizione delle mucose (secchezza vaginale, infezioni della vescica urinaria), è stata riscontrata in buona percentuale, sia al baseline che al follow up a due anni, sia nelle pazienti in TOS che in quelle non in terapia. Lo stesso è stato riscontrato per la condizione di osteoporosi, valutata attraverso l'analisi della densitometria ossea della colonna vertebrale e del femore. Per quanto concerne le malattie sistemiche, l'ipertensione è stata riscontrata maggiormente al follow up nelle donne sottoposte a TOS (46,6%), favorita da un'alimentazione errata e dalla scarsa attività fisica, e di diabete soffrivano in egual misura sia le donne in TOS che quelle non in terapia, ed anche in questo caso al follow up c'è stato un

aumento dei casi. Inoltre, una discreta percentuale delle donne arruolate per questo studio soffre di obesità. Lo sviluppo di neoplasie è stato riscontrato con maggiore frequenza delle donne non sottoposte a TOS, con un incremento dal baseline al follow up di circa il 10% (carcinoma all'utero e al colon). Nonostante il fumo costituisca un importante fattore di rischio per numerose e gravi malattie, e a dispetto delle grandi campagne di prevenzione, sia al baseline che al follow up, circa il 50% delle donne ha dichiarato di essere fumatrice (con un picco del 67% tra le donne in TOS al baseline).

Per quanto riguarda l'analisi dei parametri clinici parodontali, i risultati ottenuti dall'analisi dei livelli di igiene orale rilevati durante la visita odontoiatrica, sia al baseline che al follow up a due anni, sono riportati in Tabella 3. Alla prima visita il 73,5% delle pazienti mostrava una pessima igiene orale, e, al secondo appuntamento, il 50% mostrava placca dentale, rilevata mediante pastiglie rivelatrici, tartaro e arrossamento, e sanguinamento spontaneo della gengiva. Durante la prima visita il 26,5% delle pazienti sottoposte a TOS presentava una buona igiene orale; valore sceso però al 17,6% alla seconda visita. Un miglioramento al follow up è stato ottenuto in circa il 6% delle pazienti in TOS, mentre un livello invariato è stato riscontrato in circa il 47% di esse, che lamentavano anche disgeusia e “burning mouth syndrome”. Globalmente, in quasi metà delle pazienti è stato constatato un peggioramento dell'igiene orale, con presenza di molto tartaro, sanguinamento gengivale spontaneo durante il sondaggio, alitosi e recessioni gengivali. Nelle stesse pazienti, dall'esame radiografico si evinceva un grave riassorbimento dell'osso mascellare e mandibolare nonché gengivale, con gravi problemi di mobilità dentale di grado II. A tali pazienti è stato quindi consigliato l'utilizzo di un collutorio a base di clorexidina senza alcool al fine di inibire la formazione di placca dentale (prevenzione delle carie), per il trattamento dell'alitosi, della xerostomia e per la disinfezione completa del cavo orale.

Per quanto riguarda i batteri rilevati mediante l'analisi molecolare dei campioni di placca prelevati, i risultati globali sono riepilogati nella Tabella 4. In questa Tabella sono riportate le percentuali con cui le 12 specie batteriche esaminate, tra i quali figurano indubbiamente i batteri più frequentemente associate alla parodontite, sono state individuate nelle pazienti in TOS, nelle pazienti non in terapia, e in totale, sia al baseline, che al follow up. Riguardo ai dati globali, il dato che emerge subito è la maggiore frequenza di isolamento di tutti i batteri esaminati al follow up rispetto al baseline, a volte anche in maniera significativa. È questo il caso di *P. endodontalis*, *P. melaninogenica*, *T. denticola* e, soprattutto, di *T. forsythia*. Quest'ultima, al follow up è risultata presente addirittura più del doppio che al baseline, con una differenza percentuale di quasi il 40%, che è di gran lunga la più alta di tutte, compresa quella delle altre specie appena citate (17,6%, 26,5% e 20,6%, rispettivamente). Le differenze meno grandi, invece, tutte inferiori al 10%, si riscontrano in *P. gingivalis*, *P. nigrescens* e *V. parvula*. Per quanto riguarda, invece, le pazienti in terapia, il quadro si presenta diverso. In questo caso, infatti, 2 delle specie appena citate, *P. gingivalis* e *P. nigrescens*, sono state isolate più frequentemente al baseline che non al follow up, e, tra le specie riscontrate sensibilmente più spesso al follow up, spicca la presenza di *P. intermedia*, per la quale la differenza è addirittura pari a quella osservata in *T. forsythia* (33,3%). Non sorprende, quindi, a questo punto, che, nelle pazienti non in terapia, *P. intermedia*, il cui riscontro al baseline e al follow up è in controtendenza con l'andamento generale, sia l'unica specie a essere maggiormente presente alla prima visita che non alla seconda. Va, inoltre, segnalato che, questa volta, il primato della differenza più ampia non spetta a *T. forsythia*, bensì a *P. melaninogenica*, nella quale il riscontro al follow up è superiore rispetto a quello al baseline addirittura di più del 50%.

Alla luce dei risultati relativi all'igiene orale e di quelli riguardanti la presenza dei batteri, la deduzione più ovvia è che il maggiore riscontro di tutte le specie batteriche al follow up rispetto al baseline, sia in relazione con il

peggioramento mediamente riscontrato nelle condizioni di igiene orale delle pazienti nel corso della seconda visita. Per supportare, o meno, questa teoria, è stata creata una tabella (Tabella 5), in cui è stato riportato il numero di differenti specie batteriche individuate nelle pazienti al baseline e al follow up, ed il loro stato di igiene orale al follow up rispetto al baseline. Come si evince da questa tabella, la correlazione non è affatto frequente. Basti osservare che, in una delle 2 pazienti in cui l'igiene orale era migliorata, il numero di specie rilevate è quasi raddoppiato (da 6 a 11), mentre in solo 3 delle altre 7 pazienti in cui il numero di specie era aumentato significativamente (4 o più specie in più), l'igiene orale era peggiorata. D'altra parte, va anche segnalato che, delle 6 pazienti in cui sono state individuate più specie al baseline che al follow up, solo una risultava avere una igiene peggiore al follow up, e quella con la maggiore diminuzione (3 specie in meno), era l'altra paziente in cui si è avuto un miglioramento dell'igiene stessa.

Verosimilmente, mediante un'analisi più approfondita, quale quella che si potrebbe ottenere mediante saggi quantitativi effettuati con la real-time PCR, e con una casistica ancora più ampia (più pazienti, sia in TOS che non), sarebbe possibile avere informazioni più utili, soprattutto riguardo alla correlazione tra le varie specie batteriche, lo stato di igiene orale delle pazienti ed altre variabili correlate alla menopausa (TOS, osteoporosi, ecc.). Sono, comunque, in corso studi di biologia molecolare, sempre basati sulla PCR, con i quali verranno ottenuti dati di tipo semi-quantitativo riguardo alla presenza dei batteri nei campioni di placca subgengivale prelevati dalle pazienti in menopausa, e i cui risultati forniranno sicuramente spunti interessanti in vista di ulteriori e più approfondite ricerche.

CONCLUSIONI

Progressi nella conoscenza dell'ecologia microbica del biofilm della placca dentale e della sua interazione con i tessuti dell'ospite hanno portato a numerosi cambiamenti nell'interpretazione delle malattie parodontali. Fino alla metà del XX secolo si riteneva che l'eziologia delle parodontiti fosse ascrivibile all'accumulo, nel tempo, della placca dentale. Questo concetto è stato avvalorato da studi epidemiologici che hanno dimostrato una correlazione tra le parodontiti, l'età e la quantità di placca presente, nonché dagli studi sulla storia naturale della parodontite, descritta come una malattia con un lento e progressivo decorso. Questa teoria, definita come "ipotesi della placca non specifica", assumeva che tutti i batteri della placca fossero capaci, in eguale misura, di causare malattia. L'esordio della malattia e la sua progressione erano considerati il risultato dell'incremento nella quantità di placca al di sopra di un livello soglia, oltre il quale le difese dell'ospite non fossero più in grado di neutralizzare i batteri della placca ed i loro prodotti tossici. Numerose osservazioni, tuttavia, hanno portato ad un cambiamento di tale ipotesi; ad esempio, molti individui con una notevole quantità di placca, tartaro e gengivite non sviluppano mai una malattia parodontale distruttiva. È stato osservato, inoltre, che in molti individui con parodontite possono essere presenti gravi lesioni localizzate vicino a siti che non mostrano alcun danno tissutale. L'insieme di queste osservazioni non sono concordi con il concetto che tutti i batteri presenti nella placca possono avere la medesima patogenicità. Nell'ultima parte del XX secolo, grandi passi in avanti sono stati fatti nell'allestimento di tecniche per coltivare i batteri della placca dentale ed il risultato è stato la caratterizzazione e la definizione tassonomica di nuove specie batteriche peculiari della placca dentale. Sono state descritte differenze nette nella composizione della placca tra i siti sani e i siti malati, fornendo le basi per il riconoscimento di una eziologia specifica della parodontite. L'ipotesi della placca specifica, definita intorno agli anni settanta, rafforza il concetto secondo cui la patogenicità della placca dipende dalla presenza o dall'incremento di

specifici microrganismi. Un elemento di novità che introduce l'ipotesi della placca specifica è che i batteri della placca non sono egualmente patogeni e che soltanto batteri specifici presenti nella placca sono responsabili dei cambiamenti gengivali che portano alla parodontite distruttiva. I nostri risultati hanno dimostrato che le donne coinvolte in questo studio non godono di una buona salute orale. Queste osservazioni sono in parte spiegate dal fatto che, nonostante le campagne di prevenzione e le visite dal dentista aumentino così come l'allungamento della vita media, molti problemi parodontali si verificano ancora.

È interessante notare come l'utilizzo della terapia ormonale sostitutiva non abbia ridotto la prevalenza di sintomatologia menopausale. Ciò è in contrasto con gli studi presenti in letteratura. Il ruolo della TOS nel migliorare i sintomi orali è ancora controverso. Sembra che l'effetto della TOS sia spiccatamente individuale, per cui alcune donne con sintomi correlati alla menopausa beneficiano di tale trattamento, mentre altre no.

Sono necessari, pertanto, ulteriori studi con più tempo di follow up per valutare l'effetto della TOS sui parametri di salute orale.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Gracia CR, Sammel MD, Freeman EW, et al. Defining menopause status: creation of a new definition to identify the early changes of the menopausal transition. *Menopause*. 2005 Mar;12(2):128-35.
- 2) Lund KJ. Menopause and the menopausal transition. *Med Clin North Am*. 2008 Sep;92(5):1253-71, xii.
- 3) Stepaniak U, Szafraniec K, Kubinova R, et al. Age at natural menopause in three Central and Eastern European urban populations: the HAPIEE study. *Maturitas*. 2013 May;75(1):87-93.
- 4) Palacios S, Henderson VW, Siseles N, Tan D, Villaseca P. Age of menopause and impact of climacteric symptoms by geographical region. *Climacteric*. 2010 Oct;13(5):419-28.
- 5) Skala CE, Petry IB, Albrich SB, Puhl A, et al. The effect of hormonal status on the expression of estrogen and progesterone receptor in vaginal wall and periurethral tissue in urogynecological patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010 Nov;153(1):99-103.
- 6) Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, et al. Understanding weight gain at menopause. *Climacteric*. 2012 Oct;15(5):419-29.
- 7) Nedergaard A, Henriksen K, Karsdal MA, Christiansen C. Menopause, estrogens and frailty. *Gynecol Endocrinol*. 2013 May;29(5):418-23.
- 8) Greenblum CA, Rowe MA, Neff DF, Greenblum JS. Midlife women: symptoms associated with menopausal transition and early postmenopause and quality of life. *Menopause*. 2013 Jan;20(1):22-7.
- 9) Woods NF. Menopause, symptoms, and quality of life: time for a theoretical framework. *Menopause*. 2010 Sep-Oct;17(5):892-3.
- 10) Dennerstein L, Lehert P, Heinemann K. Epidemiology of premenstrual symptoms and disorders. *Menopause Int*. 2012 Jun;18(2):48-51).
- 11) Freeman EW. Associations of depression with the transition to menopause. *Menopause*. 2010 Jul;17(4):823-7.
- 12) Weber MT, Maki PM, McDermott MP. Cognition and mood in perimenopause: A systematic review and meta-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Jun 14. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.06.001
- 13) Carpenter JS, Studts JL, Byrne MM. A systematic review of menopausal symptom management decision aid trials. *Maturitas*. 2011 May;69(1):11-21.
- 14) Goodman NF, Cobin RH, Ginzburg SB, Katz IA, et al. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of menopause: executive summary of recommendations. *Endocr Pract*. 2011 Nov-Dec;17(6):949-54.
- 15) Cobin RH, Futterweit W, Ginzburg SB, Goodman NF, Kleerekoper M, Licata AA, Meikle AW, Petak SM, Porte KL, Sellin RV, Smith KD, Verso MA, Watts NB; AACE Menopause Guidelines Revision Task Force. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of menopause. *Endocr Pract*. 2006 May-Jun;12(3):315-37.
- 16) Davey DA. Update: estrogen and estrogen plus progestin therapy in the care of women at and after the menopause. *Womens Health (Lond Engl)*. 2012 Mar;8(2):169-89.

- 17) Utian WH, Woods NF. Impact of hormone therapy on quality of life after menopause. 2013 Oct;20(10):1098-105.
- 18) Pines A, Sturdee DW, MacLennan AH. Quality of life and the role of menopausal hormone therapy. *Climacteric*. 2012 Jun;15(3):213-6.
- 19) Genazzani A, Gambacciani M, Simoncini T, Anniverno R, et al. Italian position statement on hormone replacement therapy following the National Conference on Menopause and Hormone Replacement Therapy. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23(8):436-44.
- 20) Tsilidis KK, Allen NE, Key TJ, Dossus L, et al. Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Causes Control*. 2011 Aug;22(8):1075-84.
- 21) Ritte R, Lukanova A, Berrino F, Dossus L, et al. Adiposity, hormone replacement therapy use and breast cancer risk by age and hormone receptor status: a large prospective cohort study. *Breast Cancer Res*. 2012 May 14;14(3):R76.
- 22) Yanikkerem E, Koltan SO, Tamay AG, Dikayak Ş. Relationship between women's attitude towards menopause and quality of life. *Climacteric*. 2012 Dec;15(6):552-62.
- 23) Fichera M, Rinaldi N, Tarascio M, Taschetta S, et al. Indications and contraindications of hormone replacement therapy in menopause. *Minerva Ginecol*. 2013 Jun;65(3):331-344.
- 24) Panay N, Hamoda H, Arya R, Savvas M; British Menopause Society and Women's Health Concern. The 2013 British Menopause Society; Women's Health Concern recommendations on hormone replacement therapy. *Menopause Int*. 2013 Jun;19(2):59-68.
- 25) Mendoza N, Abad P, Baró F, Cancelo MJ, et al. Spanish Menopause Society position statement: use of tibolone in postmenopausal women. *Menopause*. 2013 Jul;20(7):754-60.
- 26) Maximov PY, Lee TM, Jordan VC. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Curr Clin Pharmacol*. 2013 May;8(2):135-55.
- 27) Lethaby AE, Brown J, Marjoribanks J, Kronenberg F, et al. Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD001395.
- 28) North American Menopause Society. The 2012 hormone therapy position statement of: The North American Menopause Society. *Menopause*. 2012 Mar;19(3):257-71.
- 29) Shao H, Breitner JC, Whitmer RA, Wang J, et al. Hormone therapy and Alzheimer disease dementia: new findings from the Cache County Study. *Neurology*. 2012 Oct 30;79(18):1846-52.
- 30) Crandall CJ, Barrett-Connor E. Endogenous sex steroid levels and cardiovascular disease in relation to the menopause: a systematic review. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013 Jun;42(2):227-53.
- 31) Brown S. HRT reduces cardiovascular endpoints in ten-year trial. *Menopause Int*. 2012 Dec;18(4):127.
- 32) Mueck AO. Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular disease: the value of transdermal estradiol and micronized progesterone. *Climacteric*. 2012 Apr;15 Suppl 1:11-7.
- 33) Andersen L, Friis S, Hallas J, Ravn P, Schröder HD, Gaist D. Hormone replacement therapy increases the risk of cranial meningioma *Eur J Cancer*. 2013 Oct;49(15):3303-10.
- 34) Fan ZX, Shen J, Wu YY, Yu H, Zhu Y, Zhan RY. Hormone replacement therapy and risk of meningioma in women: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2013 Aug;24(8):1517-25.

- 35) Tarkkila L, Furuholm J, Tiitinen A, Meurman JH. Oral health in perimenopausal and early postmenopausal women from baseline to 2 years of follow-up with reference to hormone replacement therapy. *Clin Oral Investig*. 2008 Sep;12(3):271-7.
- 36) Meurman JH, Tarkkila L, Tiitinen A. The menopause and oral health. *Maturitas*. 2009 May 20;63(1):56-62.
- 37) Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2013 Jun;62(1):59-94.
- 38) Matthew S. Ames, Semi Hong, Hye Ri Lee, Henry W. Fields, et al. Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Arch Oral Biol*. 2010 Aug;55(8):599-605.
- 39) Güncü GN, Tözüm TF, Çağlayan F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium--review of literature. *Aust Dent J*. 2005 Sep;50(3):138-45.
- 40) Preshaw PM. Oral contraceptives and the periodontium. *Periodontol 2000*. 2013 Feb;61(1):125-59.
- 41) Otomo-Corgel J. Dental management of the female patient. *Periodontol 2000*. 2013 Feb;61(1):219-31.
- 42) Kumar PS. Sex and the subgingival microbiome: do female sex steroids affect periodontal bacteria? *Periodontol 2000*. 2013 Feb;61(1):103-24.
- 43) Egea L, Le Borgne H, Samson M, Boutigny H, et al. Oral infections and pregnancy: Knowledge of health professionals. *Gynecol Obstet Fertil*. 2013 Nov;41(11):635-40.
- 44) Becerik S, Özçaka O, Nalbantsoy A, Atilla G, et al. Effects of menstrual cycle on periodontal health and gingival crevicular fluid markers. *J Periodontol*. 2010 May;81(5):673-81.
- 45) Calil CM, Lima PO, Bernardes CF, Groppo FC, Bado F, Marcondes FK. Influence of gender and menstrual cycle on volatile sulphur compounds production. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 1107–1112.
- 46) Fischer CC, Persson RE, Persson GR. Influence of the menstrual cycle on the oral microbial flora in women: a case-control study including men as control subjects. *J Periodontol* 2008; 79: 1966–1973.
- 47) Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Cuesta P, Bascones-Martínez A. Gingival changes during pregnancy: III. Impact of clinical, microbiological, immunological and socio-demographic factors on gingival inflammation. *J Clin Periodontol*. 2012 Mar;39(3):272-83.
- 48) Bieri RA, Adriaens L, Spörri S, Lang NP, Persson GR. Gingival fluid cytokine expression and subgingival bacterial counts during pregnancy and postpartum: a case series. *Clin Oral Investig*. 2013 Jan;17(1):19-28.
- 49) Basavaraju A, Durga S V, Vanitha B. Variations in the oral anaerobic microbial flora in relation to pregnancy. *J Clin Diagn Res*. 2012 Nov;6(9):1489-91.
- 50) Gursoy M, Pajukanta R, Sorsa T, Kononen E. Clinical changes in periodontium during pregnancy and postpartum. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 576–583.
- 51) Mendoza N, Sánchez-Borrego R, Villero J, Baró F, et al. 2013 Up-date of the consensus statement of the Spanish Menopause Society on postmenopausal osteoporosis *Maturitas*. 2013 Sep;76(1):99-107.
- 52) Martínez-Maestre MÁ, González-Cejudo C, Machuca G, Torrejón R, Castelo-Branco C. Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. *Climacteric*. 2010 Dec;13(6):523-9.

- 53) Otomo-Corgel J. Osteoporosis and osteopenia: implications for periodontal and implant therapy. *Periodontol* 2000. 2012 Jun;59(1):111-39.
- 54) Favus MJ. Bisphosphonates for osteoporosis. *N Engl J Med*. 2010 Nov 18;363(21):2027-35.
- 55) Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011 Apr 9;377(9773):1276-87.
- 56) Kühl S, Walter C, Acham S, Pfeffer R, Lambrecht JT. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--a review. *Oral Oncol*. 2012 Oct;48(10):938-47.
- 57) Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 May;62(5):527-34.
- 58) Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Jun;6(3):307-12.
- 59) Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011 Jul;49(1):34-41.
- 60) Sedghizadeh PP, Yooseph S, Fadrosch DW, Zeigler-Allen L, et al. Metagenomic investigation of microbes and viruses in patients with jaw osteonecrosis associated with bisphosphonate therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Dec;114(6):764-70.
- 61) Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, et al. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Apr;66(4):767-75.
- 62) Kos M, Luczak K. Bisphosphonates promote jaw osteonecrosis through facilitating bacterial colonisation. *Biosci. Hypotheses*, 2 (2009) 34–36.
- 63) Borromeo GL, Tsao CE, Darby IB, Ebeling PR. A review of the clinical implications of bisphosphonates in dentistry. *Aust Dent J*. 2011 Mar;56(1):2-9.
- 64) Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, et al. Periodontal Disease as a Risk Factor for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *J Periodontol*. 2013 Jun 20.
- 65) Grant BT, Amenedo C, Freeman K, Kraut RA. Outcomes of placing dental implants in patients taking oral bisphosphonates: a review of 115 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Feb;66(2):223-30.
- 66) Fleisher KE, Glickman RS. Risk factors for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Apr;69(4):959; author reply 959-60.
- 67) Tsao C, Darby I, Ebeling PR, Walsh K, et al. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Aug;71(8):1360-6.
- 68) Otto S, Schreyer C, Hafner S, Mast G, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012 Jun;40(4):303-9.
- 69) Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Elad S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a single-center study of 101 patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Apr;67(4):850-5.
- 70) Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S11-26.

- 71) Matesanz-Pérez P, García-Gargallo M, Figuero E, et al. A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2013 Mar;40(3):227-41.
- 72) Sgolastra F, Gatto R, Petrucci A, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2012 Oct;83(10):1257-69.
- 73) Nibali L, Farias BC, Vajgel A, Tu YK, Donos N. Tooth loss in aggressive periodontitis: a systematic review. *J Dent Res*. 2013 Oct;92(10):868-75.
- 74) Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):137-43.
- 75) Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2012 Jun;83(6):731-43.
- 76) Gonçalves LS, Gonçalves BM, Fontes TV. Periodontal disease in HIV-infected adults in the HAART era: Clinical, immunological, and microbiological aspects. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1385-96.
- 77) Dalla Torre D, Burtscher D, Jank S, Kloss FR. Necrotizing periodontitis as a possible manifestation of common variable immunodeficiency. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Dec;41(12):1546-9.
- 78) Agrawal P, Sanikop S, Patil S. New developments in tools for periodontal diagnosis. *Int Dent J*. 2012 Apr;62(2):57-64.
- 79) Landry RG, Jean M. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. *Int Dent J*. 2002 Feb;52(1):35-40.
- 80) Dhingra K, Vandana KL. Indices for measuring periodontitis: a literature review. *Int Dent J*. 2011 Apr;61(2):76-84.
- 81) Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S113-34.
- 82) Chapple IL, Genco R; working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S106-12.
- 83) Dietrich T, Sharma P, Walter C, et al. The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S70-84.
- 84) Schenkein HA, Loos BG. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S51-69.
- 85) Markou E, Boura E, Tsalikis L, Deligianidis A, Konstantinidis A. The influence of sex hormones on proinflammatory cytokines in gingiva of periodontally healthy premenopausal women. *J Periodontal Res*. 2011 Oct;46(5):528-32.
- 86) Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S181-94.

- 87) Horton AL, Boggess KA. Periodontal disease and preterm birth. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2012 Mar;39(1):17-23, vii.
- 88) Karimbux NY, Saraiya VM, Elangovan S, Allareddy V, et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2012 Nov;83(11):1407-19.
- 89) Ayazi G, Pirayesh M, Yari K. Analysis of interleukin-1 β gene polymorphism and its association with generalized aggressive periodontitis disease. *DNA Cell Biol.* 2013 Jul;32(7):409-13.
- 90) Bergström J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol.* 2000 Aug;71(8):1338-47.
- 91) Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005 Nov 19;366(9499):1809-20.
- 92) Makino A, Yamada S, Okuda K, Kato T. Nicotine involved in periodontal disease through influence on cytokine levels. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Mar;52(2):282-6.
- 93) Sun A, Wu KM, Wang YP, Lin HP, et al. Burning mouth syndrome: a review and update. *J Oral Pathol Med.* 2013 Oct;42(9):649-55.
- 94) Abetz LM, Savage NW. Burning mouth syndrome and psychological disorders. *Aust Dent J.* 2009 Jun;54(2):84-93.
- 95) Minicucci EM, Pires RB, Vieira RA, Miot HA, Sposto MR. Assessing the impact of menopause on salivary flow and xerostomia. *Aust Dent J.* 2013 Jun;58(2):230-4.
- 96) Alajbeg I, Falcão DP, Tran SD, Martín-Granizo R, et al. Intraoral electrostimulator for xerostomia relief: a long-term, multicenter, open-label, uncontrolled, clinical trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Jun;113(6):773-81.
- 97) von Bültzingslöwen I, Sollecito TP, Fox PC, Daniels T, et al. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Mar;103 Suppl:S57.e1-15.
- 98) Khalil Boutaga, Arie Jan Van Winkelhoff, Christina M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, Paul H. M. Savelkoul. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol.* 2006 Jun;33(6):427-33.
- 99) Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 Aug 1;45(2):191-9.
- 100) Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87.
- 101) Bruce J. Paster, Ingar Olsen, Jørn A. Aas, Floyd E. Dewhirst. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000. 2006;42:80-7.
- 102) Stanley C. Holt, Jeffrey L. Ebersole. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005;38:72-122.
- 103) Colombo AP, Bennet S, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst FE, Paster BJ. Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and

individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. J Periodontol. 2012 Oct;83(10):1279-87.

104) J. König, B. Holtfreter, T. Kocher. Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services – position paper 1. Eur J Dent Educ. 2010 May;14 Suppl 1:4-24.

105) Baelum V, López R. Periodontal disease epidemiology - learned and unlearned? Periodontol 2000. 2013 Jun;62(1):37-58.

106) Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. J Periodontal Res. 2010 Jun;45(3):389-95.

107) López-Marcos JF, García-Valle S, García-Iglesias AA. Periodontal aspects in menopausal women undergoing hormone replacement therapy. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005 Mar-Apr;10(2):132-41.

108) Tarkkila L, Kari K, Furuholm J, Tiitinen A, Meurman JH. Periodontal disease-associated micro-organisms in peri-menopausal and post-menopausal women using or not using hormone replacement therapy. A two-year follow-up study. BMC Oral Health. 2010 Apr 29;10:10.

109) Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. Periodontol 2000. 2010 Jun;53:55-69.

110) Sultan N, Rao J. Association between periodontal disease and bone mineral density in postmenopausal women: a cross sectional study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011 May 1;16(3).

111) Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004 Nov 1;15(6):403-13. Review.

112) Brennan RM, Genco RJ, Wilding GE, Hovey KM, Trevisan M, Wactawski-Wende J.J Bacterial species in subgingival plaque and oral bone loss in postmenopausal women. Periodontol. 2007 Jun;78(6):1051-61.

113) Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996 Aug;11(4):266-73.

114) Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin Infect Dis. 1995 Jun;20 Suppl 2:S304-7.

115) Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. Int Endod J. 2003 Mar;36(3):174-80.

116) Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. J Endod. 1997 Jul;23(7):433-8.

117) Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. J Med Microbiol. 2007 Jan;56(Pt 1):110-8.

118) Seol JH, Cho BH, Chung CP, Bae KS. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. J Endod. 2006 Feb;32(2):110-4.

119) Haraldsson G, Holbrook WP. Identifying clinically important gram-negative anaerobes from the oral cavity. Eur J Oral Sci. 1999 Dec;107(6):429-36.

- 120) Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007 Feb;103(2):285-8. Epub 2006 Sep 26.
- 121) Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. Int Endod J. 1999 May;32(3):204-10.
- 122) Rôças IN, Siqueira JF Jr. Culture-independent detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in primary endodontic infections. J Endod. 2006 Jun;32(6):509-12.

TABELLE

Tabella 1 - Descrizione della popolazione in studio e condizioni di salute orale al baseline e al follow up a due anni

Paz.	Età	TOS	N. elementi dentari	Trattamenti eseguiti	Parametri clinici baseline	Parametri clinici follow up	Note
01	50	Si	21 11 superiori 10 inferiori	Terapia canalare Protesi fissa Avulsioni dentarie	BOP: L, V PI: 3 PPD: 3 mm REC: II classe CAL: 2 mm MD: grado III	nessun follow up	Ansiosa; Bruxista; Allergia antibiotici; Scarsa igiene orale; Necessita ablazione tartaro; Osteoporosi; Fumatrice
02-04	57	No	29 15 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: L, MV PI: 1 PPD: 4 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: 1	BOP: L, MV PI: 1 PPD: 5 mm REC: III classe CAL: 2,5 mm MD: 3	Necessita ablazione tartaro; <u>Igiene orale peggiore</u> ; Osteoporosi; Diabete; Fumatrice
03-01	53	No	28 14 superiori 14 inferiori	Mai andata dal dentista	BOP: ML, DV PI: 0 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: 0	BOP: ML, DV PI: 0 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: 0	Necessita ablazione tartaro; <u>Igiene orale invariata</u> ; Fumatrice; Ipertensione
04	63	No	22 12 superiori 10 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL PI: 3 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 2 mm MD: grado I	nessun follow up	Necessita ablazione tartaro; Fumatrice; Osteoporosi; Diabete
05	48	No	28 13 superiori 15 inferiori	Avulsioni dentarie Terapie canalari Cure carie Protesi fissa	BOP: L, V PI: 0 PPD: 0,5 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: 0	nessun follow up	Buona igiene orale; Ipertensione; Osteoporosi
06-02	51	Si	25 13 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie Terapie canalari Terapia ortodontica Protesi fissa Implantologia	BOP: L, V PI: 0 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: 0	BOP: L, V PI: 2 PPD: 3 mm REC: I classe CAL: 2 mm MD: 2	Necessita ablazione tartaro; Ipertensione; Fumatrice; Diabete; Osteoporosi; <u>Igiene orale peggiore</u>
07-05	68	No	27 12 superiori 15 inferiori	Avulsioni dentarie Terapie canalari Cure carie Protesi fissa	BOP: ML, V PI: 3 PPD: 1 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado I	BOP: ML, V PI: 2 PPD: 1 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado I	Necessita ablazione tartaro; <u>Igiene orale migliore</u> ; Fumatrice; Osteoporosi; Cardiopatia; Obesità; Neoplasia
08	58	Si	23 10 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Implantologia	BOP: V PI: 1 PPD: 0,5 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: 0	nessun follow up	Buona igiene orale; TOS da 5 anni
09	53	No	24 11 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: V, L, DL PI: 1 PPD: 2 mm REC: 0 CAL: 1 mm MD: 0	nessun follow up	Necessita ablazione tartaro; Ex fumatrice; Ipertensione
10-06	56	No	23 10 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Terapie canalari Cure carie Protesi fissa Protesi mobile	BOP: ML, L, DL, VBOP: ML, L, DL, V PI: 3 PPD: 3 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado II	PI: 3 PPD: 5 mm REC: III classe CAL: 3 mm MD: grado III	Paziente HCV+; Necessita ablazione tartaro; <u>Igiene orale peggiore</u> ; Ipertensione; Diabete; Fumatrice; Obesità

11-07	54	Si	28 12 superiori 16 inferiori	Avulsioni dentarie Terapie canalari Cure carie Protesi fissa	BOP: assente PI: 1 PPD: 2 mm REC: I classe CAL: 1,5 mm MD: 2	BOP: ML, L, DL, V PI: 2 PPD: 3 mm REC: II classe CAL: 2 mm MD: 2	<u>Igiene orale peggiore</u> ; Fu- matrice; Ipertensione; Osteoporosi
12	52	No	23 9 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie Terapie canalari Cure carie	BOP: assente PI: 0 PPD: 0,5 mm REC: I classe CAL: 0 MD: 0	nessun follow up	Buona igiene orale
13	55	No	29 15 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Protesi fissa Protesi mobile	BOP: ML, DL, V PI: 1 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	nessun follow up	Necessita ablazione tartaro
14	60	No	30 16 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: assente PI: 0 PPD: 0,5 mm REC: 0 CAL: 0,5 mm MD: 0	nessun follow up	Necessita ablazione tartaro
15-08	57	No	25 13 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi mobile	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 2 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 2 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	Carcinoma utero; Necessita ablazione tarta- ro; <u>Igiene orale invariata</u> ; Ipertensione; Osteoposi; Fumatrice
16-09	55	Si	28 14 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa	BOP: V, L PI: 1 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado I	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 2 mm REC: I classe CAL: 2 mm MD: grado I	TOS dal 2009; <u>Igiene orale peggiore</u> ; Fumatrice; Iper- tensione; Diabete
17	52	No	30 16 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: V,L, ML, DL PI: 2 PPD: 2mm REC: I classe CAL: 1,5 mm MD: grado I	nessun follow up	Necessita ablazione tarta- ro; Fumatrice; Osteoporosi
18	50	No	29 17 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: L,V, ML, DL PI: 2 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado II	nessun follow up	Fumatrice; Necessita abla- zione tartaro
19	55	No	29 16 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Terapie canalari Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 0,5 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	nessun follow up	Gengivite acuta; Necessita ablazione tartaro; Fumatrice; Ipertensione; Osteopo- rosi
20-10	79	No	21 11 superiori 10 inferiori	Avulsioni dentarie Terapie canalari Cure carie Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1,5 mm REC: IIIclasse CAL: 1 mm MD: grado III	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1,5 mm REC: IIIclasse CAL: 1 mm MD: grado III	Necessita ablazione tarta- ro; <u>Igiene orale invariata</u> ; Osteoporosi; Ipertensione; Diabete; Carcinoma colon; Obesità; Cardiopatia

21-11	74	No	23 14 superiori 9 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: III classe CAL: 1,5 mm MD: grado II	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 4 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	Necessita ablazione tartaro; HCV+; <u>Igiene orale peggiore</u> ; Diabete; Osteoporosi; Carcinoma utero; Ipertensione; Obesità; Cardiopatia
22	60	No	30 16 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapia canalare Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado I	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Fumatrice; Ipertensione; Cardiopatia
23-12	50	No	28 16 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapie canalari	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 2 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 2 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	Sindrome di Sjogren; <u>Igiene orale invariata</u> ; Ipertensione; Fumatrice
24	50	Si	30 27 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapie canalari	BOP: L, V, ML, DL PI: 2 PPD: 1 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado I	nessun follow up	Necessita ablazione tartaro; TOS da agosto 2010
25	53	No	28 11 superiori 17 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	nessun follow up	Gengivite acuta
26	60	No	25 13 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado II	nessun follow up	Gengivite acuta; Sanguinamento spontaneo; Necessita ablazione tartaro
27-13	60	Si	26 11 superiori 15 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapie canalari Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado II	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 2,5 mm REC: II classe CAL: 2 mm MD: grado II	Gengivite acuta; Sanguinamento spontaneo; Necessita ablazione tartaro; <u>Igiene orale peggiore</u> ; Osteoporosi; Ipertensione
28-14	45	No	25 14 superiori 11 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2,5 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2,5 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	Scarsa igiene orale; Fumatrice (20 die); Sanguinamento spontaneo; <u>Igiene orale invariata</u>
29	50	No	26 12 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado I	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Ipertensione; Osteoporosi

30	50	No	29 15 superiori 14 inferiori		BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 1,5 mm MD: grado 2	nessun follow up	Scarsa igiene orale
31-15	52	Si	26 14 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: I classe CAL: 1,5 MD: grado II	Sclerosi multipla; Scarsa igiene orale; San- guinamento spontaneo; <u>Igiene orale peggiore;</u> Osteoporosi; Fumatrice
32-16	74	No	27 15 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 2, 5 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado II	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 3 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	Scarsa igiene orale; San- guinamento spontaneo; <u>Igiene orale peggiore;</u> Osteoporosi; Diabete; Ipertensione; Carcinoma seno
33	52	No	30 denti 16 superiori 14 inferiori	Paziente odontofobica nessun trattamento	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 0,5 mm REC: 0 CAL: 0,5 mm MD: 0	nessun follow up	Buona igiene orale; Iper- tensione; Fumatrice
34-17	65	No	26 14 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 1,5 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 1,5 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; <u>Igiene orale invariata;</u> Osteoporosi; Fumatrice; Ipertensione; Diabete; Car- diopatia
35	63	No	32 16 superiori 16 inferiori	Mai andata dal dentista	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: IV classe CAL: 2 mm MD: grado III	nessun follow up	Paziente odontofobica; Osteoporosi; Diabete; Ipertensione; Obesità; Car- diopatia
36-18	67	Si	26 15 superiori 11 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: III classe CAL: 1,5 mm MD: grado III	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 4 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; TOS dal 2005; <u>Igiene orale peggiore;</u> Diabete; Iperten- sione; Osteoporosi; Obesi- tà
37	66	Si	22 13 superiori 9 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado I	nessun follow up	Scarsa igiene orale; San- guinamento spontaneo; TOS dal 2009; Ipertensio- ne; diabete
38	66	Si	21 14 superiori 7 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: grado I	nessun follow up	Scarsa igiene orale; San- guinamento spontaneo; TOS dal 2003

39-19	61	No	22 12 superiori 10 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa Cure carie Terapia canalare	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 0,5 mm REC: I classe CAL: 0 mm MD: 0	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 0,5 mm REC: I classe CAL: 0 mm MD: 0	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; <u>Igiene orale invariata</u> ; Ipertensione; Diabete; Fumatrice; Osteoporosi
40	54	Si	25 13 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 1,5 mm MD: grado II	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Terapia con Bifosfonati (pregressa TOS nel 2010); Osteoporosi; Fumatrice
41-20	53	Si	27 16 superiori 11 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa Cure carie Terapia canalare	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1,5 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado I	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1,5 mm REC: II classe CAL: 1mm MD: grado I	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Actonel; Natecal; Fumatrice; Ipertensione; Osteoporosi; <u>Igiene orale invariata</u>
42-21	65	No	27 12 superiori 15 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapia canalare	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2,5 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2,5 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; <u>Igiene orale invariata</u> ; Ipertensione; Diabete; Fumatrice; Osteoporosi; Cardiopatia
43-22	49	Si	30 16 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa Cure carie	BOP: V, L PI: 0 PPD: 0,5 mm REC: nessuna CAL: 0 MD: 0	BOP: V, L PI: 0 PPD: 0,5 mm REC: nessuna CAL: 0 mm MD: 0	Buona igiene orale; TOS dal 2010; Ipertensione; Fumatrice; Osteoporosi; <u>Igiene orale invariata</u>
44-23	77	Si	25 14 superiori 11 inferiori	Avulsioni dentarie Protesi fissa Cure carie Terapia canalare	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 1,5 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado II	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 1,5 mm MD: grado II	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Pregresso trattamento TOS; Ipertensione; Diabete; Osteoporosi; Cardiopatia; Carcinoma colon; <u>Igiene orale peggiore</u>
45	49	Si	29 16 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 0,5 mm REC: I classe CAL: 0 mm MD: 0	nessun follow up	Sanguinamento spontaneo; Fumatrice; Ipertensione; Osteoporosi
46	51	No	28 14 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 1 mm REC: II classe CAL: 0,5 mm MD: 0	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Fumatrice; Ipertensione; Osteoporosi
47	52	No	30 17 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 1,5 mm MD: grado I	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Fumatrice; Osteoporosi

48	62	No	24 16 superiori 8 inferiori	Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2,5 mm REC: III classe CAL: 2 mm MD: grado III	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; TOS dal 2008; Ipertensione; Obesità; Osteoporosi; Diabete
49-24	60	No	28 14 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapie canalari	BOP: V, L PI: 1 PPD: 1 mm REC: nessuna CAL: 0,5 mm MD: 0	BOP: V, L PI: 1 PPD: 1 mm REC: nessuna CAL: 0,5 mm MD: 0	Buona igiene orale; <u>Igiene orale invariata</u> ; Osteoporosi; Fumatrice; Diabete; Ipertensione
50	45	No	27 16 superiori 11 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapie canalari	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0 mm MD: 0	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Fumatrice; Ipertensione
51-25	54	Si	29 16 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1, 5 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: 1	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: 1	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; TOS dal 2009; Osteoporosi; Fumatrice; Ipertensione; <u>Igiene orale peggiore</u>
52-26	65	No	24 14 superiori 10 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapie canalari Protesi mobile	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 1,5 mm REC: II classe CAL: 1 mm MD: grado II	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: II classe CAL: 2 mm MD: grado II	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Osteoporosi; Fumatrice; Ipertensione; Diabete; <u>Igiene orale peggiore</u>
53-27	61	Si	23 14 superiori 9 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado II	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: I classe CAL: 1,5 mm MD: grado III	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Osteoporosi; Fumatrice; Ipertensione; Diabete; <u>Igiene orale peggiore</u>
54-28	65	Si	28 14 superiori 14 inferiori	Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1, 5 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado I	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado I	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Osteoporosi; Fumatrice; Diabete; TOS dal 2008; <u>Igiene orale migliore</u>
55-29	58	Si	29 17 superiori 12 inferiori	Cure carie Avulsione dentaria Protesi fissa	BOP: L, V PI: 1 PPD: 0, 5 mm REC: nessuna CAL: 0 mm MD: 0	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 2 mm REC: nessuna CAL: 1,5 mm MD: 2	Fitoestrogeni; Fumatrice; Osteoporosi; Ipertensione; TOS dal 2007; <u>Igiene orale peggiore</u>
56-30	57	No	27 14 superiori 13 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 0,5 mm REC: I classe CAL: 0 mm MD: 0	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 2 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: 1	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Fumatrice; Osteoporosi; Ipertensione; Carcinoma mammario; <u>Igiene orale peggiore</u>

57-32	57	No	26 12 superiori 14 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: 0	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 1 mm MD: 0	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; Pregressa TOS; Fumatrice; Osteoporosi; <u>Igiene orale invariata</u>
58-31	52	Si	25 14 superiori 11 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Protesi fissa	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: III classe CAL: 1,5 mm MD: grado II	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2 mm REC: III classe CAL: 1,5 mm MD: grado II	Scarsa igiene orale; Sanguinamento spontaneo; TOS dal 2010; Fumatrice; Osteoporosi; <u>Igiene orale invariata</u>
59-33	52	Si	28 14 superiori 14 inferiori	Avulsione dentaria	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 0 mm REC: nessuna CAL: 0 mm MD: 0	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 1 PPD: 0 mm REC: nessuna CAL: 0 mm MD: 0	Fumatrice; Osteoporosi; <u>Igiene orale invariata</u>
60-34	57	No	25 13 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapie canalari Protesi fissa Protesi mobile	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2,5 mm REC: IV classe CAL: 1, 5 mm MD: grado II	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 3 PPD: 2,5 mm REC: IV classe CAL: 1,5 mm MD: grado II	Scarsa igiene orale; Fuma- trice; Osteoporosi; Iper- tensione; Cardiopatia; Sanguinamento spontaneo; Pregressa TOS; <u>Igiene ora- le invariata</u>
61-35	49	Si	24 13 superiori 11 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado I	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado I	Scarsa igiene orale; Fuma- trice; Osteoporosi; Sanguinamento spontaneo; <u>Igiene orale invariata</u>
62	65	No	26 11 superiori 15 inferiori	Cure carie Avulsioni dentarie	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0,5 mm MD: grado I	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Diabe- te; Iperensione; Osteopo- rosi; Sanguinamento spon- taneo; Pregressa TOS (2004)
63	69	No	30 27 superiori 13 inferiori	Non dà il consenso per il prelievo	Ha fatto solo la visi- ta senza far registra- re i parametri paro- dontali	nessun follow up	Scarsa igiene orale; Diabe- te; Osteoporosi; Sanguina- mento spontaneo
64	58	No	26 14 superiori 12 inferiori	Avulsioni dentarie Cure carie Terapie canalari	BOP: ML, L, DL, MV, V, DV PI: 2 PPD: 1 mm REC: I classe CAL: 0 mm MD: 0	nessun follow up	Nessuna terapia; Fumatri- ce; Osteoporosi; Iper- tensione

Legenda. BOP: sanguinamento al sondaggio; PI: indice di placca; PPD: profondità della tasca parodontale; REC: recessione gengivale; MOB: mobilità degli elementi dentali; ML: mesio-linguale; L: linguale; DL: disto-linguale; MV: mesio-vestibolare; V: vestibolare; DL: disto-vestibolare.

Tabella 2 – Riepilogo generale dei dati clinici rilevati (durante l'anamnesi) al baseline e al follow up a 2 anni nelle pazienti in TOS (TOS +) e non in terapia (TOS -), ed in totale.

	Baseline			Follow up		
	Totale (%)	TOS + (%)	TOS - (%)	Totale (%)	TOS + (%)	TOS - (%)
Sintomatologia menopausale	62,5	80,0	31,5	44,8	80,0	21,0
Osteoporosi	80,1	86,6	68,4	78,2	86,6	78,9
Cardiopatie	30,3	26,6	36,8	33,6	26,6	42,1
Ipertensione	34,6	33,3	36,8	42,1	46,6	42,1
Diabete	30,3	26,6	36,8	44,6	46,6	47,3
Obesità	20,2	20,0	21,0	27,8	26,6	31,5
Neoplasie	14,1	13,3	15,7	19,6	13,3	26,3
Fumo	55,8	66,7	36,8	47,5	53,3	47,3

Tabella 3 – Riepilogo generale dei parametri clinici parodontali al baseline e al follow up a 2 anni nelle pazienti in TOS (TOS +) e non in terapia (TOS -), ed in totale.

	Baseline			Follow up		
	Totale (%)	TOS + (%)	TOS - (%)	Totale (%)	TOS + (%)	TOS - (%)
PI (>2)	73,3	73,3	73,6	88,2	93,3	84,2
PPD (<3 mm)	45,8	33,3	68,5	39,1	13,3	63,2
PPD (>3 mm)	54,1	66,7	31,5	52,1	86,7	36,8
REC (I – II classe)	51,2	53,4	47,3	42,2	40	47,3
REC (III – IV classe)	48,8	46,6	52,7	53,1	60	52,7
MOB (grado I)	51,1	53,4	47,3	47,6	53,4	47,3
MOB (> grado I)	38,2	33,3	47,3	39,1	33,3	47,3
Igiene buona	21,8	8,6	7,3	5,87	6,6	10,5
Igiene scarsa	87,8	91,3	82,9	73,5	26,6	57,8
Igiene pessima	14,0	30,4	12,1	17,6	60	26,3

Tabella 4 - Batteri parodontali rilevati al baseline e al follow up a 2 anni nelle pazienti in TOS (TOS +) e non in terapia (TOS -), ed in totale.

Specie batteriche	Totale		TOS +		TOS -	
	baseline (%)	follow up (%)	baseline (%)	follow up (%)	baseline (%)	follow up (%)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	61,8	73,5	53,3	80,0	68,4	68,4
<i>C. rectus</i>	79,4	91,2	80,0	93,3	78,9	89,5
<i>E. corrodens</i>	64,7	79,4	60,0	73,3	68,4	84,2
<i>F. nucleatum</i>	61,8	73,6	60,0	80,0	63,2	68,4
<i>P. endodontalis</i>	64,7	82,4	66,7	86,7	63,2	78,9
<i>P. gingivalis</i>	50,0	58,8	60,0	53,3	42,1	63,2
<i>P. intermedia</i>	35,3	47,1	20,0	53,3	47,4	42,1
<i>P. melaninogenica</i>	52,9	79,4	73,3	80,0	36,8	89,5
<i>P. nigrescens</i>	82,4	88,2	93,3	86,7	73,7	89,5
<i>T. forsythia</i>	38,2	76,5	46,7	80,0	31,6	73,7
<i>T. denticola</i>	73,6	94,1	66,7	93,3	78,9	94,7
<i>V. parvula</i>	82,4	91,2	86,7	93,3	78,9	89,5

Tabella 5 – Raffronto tra il numero di specie batteriche rilevate nelle pazienti e il loro stato di igiene orale al follow up rispetto al baseline.

Paziente	TOS	Igiene orale			Specie batteriche presenti (n)	
		baseline	follow up	follow up vs baseline	baseline	follow up
03-01	NO	scarsa	scarsa	invariata	11	12
06-02	SI	buona	scarsa	peggiore	8	8
02-04	NO	scarsa	scarsa	peggiore	5	9
07-05	NO	scarsa	buona	migliore	6	11
10-06	NO	scarsa	scarsa	peggiore	6	8
11-07	SI	buona	scarsa	peggiore	3	9
15-08	NO	scarsa	scarsa	invariata	8	10
16-09	SI	buona	scarsa	peggiore	9	12
20-10	NO	scarsa	scarsa	invariata	6	9
21-11	NO	scarsa	scarsa	peggiore	4	7
23-12	NO	buona	buona	invariata	8	8
27-13	SI	scarsa	scarsa	peggiore	6	9
28-14	NO	scarsa	scarsa	invariata	9	7
31-15	SI	scarsa	scarsa	peggiore	7	9
32-16	NO	scarsa	scarsa	peggiore	6	10
34-17	NO	scarsa	scarsa	invariata	6	11
36-18	SI	scarsa	scarsa	peggiore	10	10
39-19	NO	scarsa	scarsa	invariata	11	12
41-20	SI	scarsa	scarsa	invariata	9	11
42-21	NO	scarsa	scarsa	invariata	9	8
43-22	SI	buona	buona	invariata	8	11
44-23	SI	scarsa	scarsa	peggiore	10	12
49-24	NO	buona	buona	invariata	9	10
51-25	SI	scarsa	scarsa	peggiore	6	9
52-26	NO	scarsa	scarsa	peggiore	12	11
53-27	SI	scarsa	scarsa	migliore	11	8
54-28	NO	scarsa	buona	peggiore	6	8
55-29	SI	buona	scarsa	peggiore	9	12
56-30	NO	scarsa	scarsa	invariata	8	7
58-31	SI	scarsa	scarsa	invariata	7	8
57-32	NO	scarsa	scarsa	invariata	3	9
59-33	SI	buona	buona	invariata	5	9
60-34	NO	scarsa	scarsa	invariata	6	10
61-35	SI	scarsa	scarsa	invariata	7	6

Tabella 6 – Specie batteriche rilevate nelle pazienti al baseline e al follow up.

Paziente	Batteri													
	AA		CR		EC		FN		PE		PG		PI	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
03-01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
06-02	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
02-04	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
07-05	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
10-06	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
11-07	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
15-08	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
16-09	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
20-10	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
21-11	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
23-12	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
27-13	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
28-14	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
31-15	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
32-16	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
34-17	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
36-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
39-19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41-20	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
42-21	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
43-22	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
44-23	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
49-24	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
51-25	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
52-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53-27	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
54-28	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
55-29	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
56-30	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
58-31	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
57-32	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
59-33	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
60-34	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
61-35	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+

Legenda. AA: *A. actinomycetemcomitans*; CR: *C. rectus*; EC: *E. corrodens*; FN: *F. nucleatum*; PE: *P. endodontalis*; PG: *P. gingivalis*; PI: *P. intermedia*; PM: *P. melaninogenica*; PN: *P. nigrescens*; TF: *T. forsythia*; TD: *T. denticola*; VP: *V. parvula*. 1: baseline; 2: follow up. +: presente; -: assente.

