

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN IGIENE DENTALE

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE

Direttore: Prof. Edoardo Stellini

TESI DI LAUREA

CORRELAZIONE TRA FUMO PASSIVO E PRESENZA DI CARIE IN ETÀ PEDIATRICA

RELATORE: Prof. Francesco Ludovichetti

CORRELATORE: Prof. Andrea Zuccon

LAUREANDO: Radu Alexandra Mihaela

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO – ABSTRACT

Riassunto.....	pag. 1
Cap 1 Introduzione	
1.1 Cenni di anatomia del dente.....	pag. 3
Smalto.....	pag. 4
Dentina	pag. 5
Cemento	pag. 6
1.2 Microbiologia del cavo orale	pag. 8
Il Biofilm	pag. 9
Colonizzazione iniziale.....	pag. 9
Shift batterico	pag. 11
Organizzazione del biofilm.....	pag. 13
La matrice del biofilm.....	pag. 14
S. Mutans	Pag. 15
1.3 La carie	pag. 16
Processo carioso.....	pag. 17
Carie in età pediatrica	pag. 19
Fattori di rischio.....	pag. 20
Processo carioso.....	pag. 21
1.4 Il fumo	pag. 24
Le sigarette classiche.....	pag. 24
Il fumo passivo.....	pag. 26
Sigarette elettroniche	pag. 27
Sigarette a tabacco riscaldato	Pag. 28
Fumo passivo da tabacco riscaldato	Pag. 29
Cap 2 Analisi statistica	pag. 31
Obiettivo dello studio	pag. 31
Materiali e metodi	pag. 31
Metodi di analisi.....	pag. 32

Risultati	pag. 35
Conclusioni.....	Pag. 37
Cap 3 Discussione	pag. 39
Cap 4 Conclusioni	pag. 47
Bibliografia.....	pag. 48

RIASSUNTO

SCOPO DEL LAVORO: In questo studio si è cercata la correlazione tra l'esposizione a fumo passivo, nei pazienti pediatrici, e la presenza di carie nella dentizione decidua. Per fare ciò si sono andate ad analizzare le abitudini dei familiari a contatto con il bambino per valutare il tipo di esposizione a diverse sorgenti di fumo passivo: fumo di sigaretta tradizionale e fumo generato dalle sigarette IQOS.

MATERIALI E METODI: Questo studio include un campione di 300 pazienti, di età compresa tra i 3 e i 6 anni, i cui genitori o tutori legali hanno deciso di aderire al servizio della clinica dentale, e che hanno dato il consenso di partecipare alla ricerca, tutti sono residenti in Italia. Un solo medico ha compiuto la prima visita del paziente. Dopo di ciò, sono stati raccolti dati sull'anamnesi del paziente, includendo domande riguardo alle abitudini alimentari del paziente per durata e tipologia. Le domande raccolte sono state implementate nell'anamnesi dell'ambulatorio e comprendono:

- Presenza in famiglia a contatto con il paziente di ex fumatori, fumatori di sigarette tradizionali, non fumatori, fumatori di IQOS
- Numero di sigarette fumate al giorno
- Eventuale esposizione del paziente al fumo: esposizione nulla, in casa, in auto, esposizione continua.

Sono state inoltre considerate le abitudini alimentari del paziente, tenendo conto del numero di bevande zuccherate, merendine e caramelle ingerite quotidianamente dal paziente.

Per tenere conto del numero di carie presenti o curate si sono utilizzati gli indici dmft per i denti decidui, DMFT per la dentizione permanente, facendo la somma in caso di paziente con dentizione mista.

In totale sono stati analizzati i dati di 300 pazienti, suddivisi in tre gruppi composti ciascuno da 100 soggetti: pazienti con familiari non fumatori, pazienti con familiari fumatori di sigarette tradizionali, pazienti con familiari fumatori di IQOS.

I dati analizzati sono stati raccolti nell'ambulatorio di odontoiatria pediatrica di Borgo Cavalli, ospedale accademico a Treviso, appartenente all'Università degli Studi di Padova.

RISULTATI: Dall'analisi statistica emerge che non vi è nessuna rilevanza statistica che possa correlare la presenza di carie all'esposizione al fumo passivo, né per le sigarette tradizionali né per le IQOS.

CONCLUSIONI: I risultati trovati si concentrano su un campione di 300 pazienti, tra questi non vi è stata trovata nessuna correlazione di rilevanza statistica che possa associare l'esposizione a fumo passivo allo sviluppo di carie. La letteratura presenta sia casi che sostengono tali risultati, ed esistono sia articoli che sottolineano la correlazione.

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Cenni di anatomia *dell'apparato stomatognatico*

L'apparato stomatognatico è composto da un insieme di organi che, nel loro insieme, ne permettono il funzionamento e la vitalità. La cavità orale è caratterizzata da un insieme di tessuti duri e mucose, cheratinizzate e non cheratinizzate, la cui salute dipende dalle abitudini di vita del singolo individuo. Tutte le superfici della bocca sono colonizzate da una complessa flora batterica che, con cattive abitudini o una cattiva alimentazione, può andare incontro a disbiosi e generare patologie più o meno trattabili. Con corrette abitudini ed una corretta e attenta igiene si può aiutare a prevenire l'insorgere di tali malattie.

All'interno del cavo orale sono presenti gli elementi dentari, questi sono inseriti all'interno degli alveoli ossei, con i quali si articolano per mezzo di una gonfosi, tutto il complesso è sostenuto e nutrito dal legamento parodontale. Quest'ultimo, assieme al cemento radicolare e la gengiva, compone una rete di sostegno degli elementi dentari.

Il dente è un organo fondamentale per l'alimentazione, la sua durezza agevola la masticazione e permette il primo passaggio della digestione. Si suddivide in una porzione superiore chiamata "corona" ed in una inferiore detta "radice" dentaria, che si posiziona all'interno dell'alveolo, si distingue inoltre tra corona anatomica, la porzione di corona ricoperta da smalto, e corona clinica, parte di corona visibile.

La radice è separata dalla corona da una porzione intermedia chiamata colletto, che è la zona di transizione dove trova luogo la giunzione amelocementizia, punto di passaggio tra smalto e cemento.

La maggior parte della struttura del dente è costituita dalla dentina, un tessuto connettivo mineralizzato e non vascolarizzato, essa inoltre si distingue in dentina coronale ricoperta dallo smalto e in dentina radicolare rivestita dal cemento.

Ciascun dente presenta una cavità centrale detta camera pulpare all'interno della quale si trova la polpa, che è un tessuto connettivo riccamente innervato e vascolarizzato. All'apice di ciascuna radice questa cavità comunica con il parodonto per mezzo di un foro apicale.

Lo smalto

Lo smalto è un tessuto acellulare costituito da sali minerali cristallizzati, fosfato di calcio (idrossiapatite) e da una esigua componente organica. Esso è composto dagli ameloblasti, i quali, una volta terminata la loro funzione, che consiste nel rivestire la corona, muoiono. Nei denti umani lo spessore dello smalto varia da 2-2,5 mm, nelle cuspidi, a 1-1.3 mm nelle superfici laterali e si assottiglia fino a pochi micrometri a livello della zona di giunzione con la radice. È un tessuto acellulare ed è il più duro del nostro organismo. Esso è formato per il 95% da sali minerali cristallizzati e da una esigua componente organica pari all'1%.

Esso è formato da grossi cristalli di idrossiapatite che sono ordinati in colonne che si estendono in modo quasi perpendicolare alla giunzione amelo-dentinale, mantenendo una posizione quasi parallela tra loro. Queste colonne sono dette prismi, la loro forma in sezione trasversale ha la forma a “buco di serratura”. I prismi dello smalto sono disposti in file sovrapposte, assumono un decorso ondulato e perpendicolare alla superficie esterna del dente. Tali prismi sono uniti da smalto interprismatico ed occupano tutto lo spessore dello smalto. Nonostante questo tessuto sia estremamente duro, esso è anche molto fragile e la sua struttura può rompersi facilmente lungo i prismi se non sostenuto dalla dentina sottostante. Una tra le principali proprietà fisiche dello smalto è la conducibilità termica. Questa è una caratteristica importante in quanto protegge la polpa da stimoli termici come quelle date da cibi molto caldi o freddi.

La composizione dello smalto cambia durante la vita, sia per gli eventi metabolici della placca batterica, sia per i normali processi di usura e attrito. Gli acidi prodotti dalla placca batterica dissolvono selettivamente i cristalli di apatite con elevata concentrazione di carbonato e, in misura minore, di magnesio ed i processi di remineralizzazione tendono a rimpiazzarli con fluoroapatite. Tali eventi, quindi, implicano una continua modificazione della composizione della superficie dello smalto. L'attrito rimuove gli strati esterni dello smalto e modifica i gradienti di concentrazione esistenti: la concentrazione di fluoruro superficiale può essere molto bassa quando gli strati esterni sono stati asportati. L'abrasione e l'erosione da parte di cibo, bevande o acidi atmosferici possono portare alla perdita di ingenti strati di smalto lasciando così esposta la dentina sottostante.

La dentina

La dentina è un tessuto connettivo non vascolarizzato mineralizzato che circonda la camera pulpare sia nella corona, dove sottende lo smalto, sia nella radice, dove è posta al di sotto del cemento.

Gli odontoblasti sono cellule specializzate che si trovano allineate nello strato più periferico della polpa dentaria, intimamente associati alla dentina, provvisti di lunghi processi citoplasmatici che si trovano all'interno dei tubuli dentinali. Essi sono le cellule che formano la dentina: determinano la formazione dei tubuli dentinali e i loro processi rimangono almeno parzialmente all'interno di questi.

Quando lo smalto si è formato ed il dente ha completato la fase di eruzione, non si verificano ulteriori apposizioni di smalto. Il tessuto può tuttavia essere perduto per attrito o per dissoluzione acida (come si verifica per i fenomeni erosivi e cariosi).

La dentina, invece, può formarsi durante tutta la vita.

Vengono usati termini diversi per descrivere la dentina formata in tempi e circostanze differenti. La dentina formata prima dell'eruzione del dente consiste in una matrice collagenica mineralizzata, penetrata dai processi degli odontoblasti così da dar luogo ad una struttura tubulare. I tubuli hanno un diametro di circa 2,5 μm vicino alla camera pulpare e riducono via via il loro diametro fino a circa 1 μm alla periferia della dentina, vicino alla giunzione amelo-dentinale. Il numero dei tubuli è maggiore nella dentina profonda (vicina alla polpa), dove aumentano gli odontoblasti ed è minore lo spessore del materiale mineralizzato fra i tubuli e diminuisce nella dentina periferica, ciò dimostra che molti tubuli non attraversano l'intero spessore della dentina ma terminano circa a metà o due terzi dello spessore.

Nelle aree nelle quali la dentina subisce un processo irritativo e/o patologico, come per esempio un processo carioso, una stimolazione chimica da idrossido di calcio o per la presenza di sostanze estranee all'interno dei tubuli dentinali, viene prodotto uno strato protettivo di dentina in tempi relativamente rapidi. La dentina formata più rapidamente risulta meno regolare: il reticolo tubulare può risultare irregolare e possono esserci inclusioni cellulari. Questo tipo di dentina è definito dentina di riparazione o dentina terziaria.

Essa è composta al 20% da materiale organico e all'80% da materiale inorganico.

Il collagene di tipo I è il componente più abbondante della parte organica.

Il rimanente 10%, definito con il termine di proteine non collageniche, è stato ampiamente studiato al fine di chiarirne il ruolo nel processo di mineralizzazione della dentina.

La polpa dentaria

La polpa è un tessuto connettivo di tipo mucoso contenuto all'interno della camera pulpare, la quale è circondata da odontoblasti e dentina, e prosegue nella radice come polpa radicolare. Il diametro del canale pulpare diminuisce via via che ci si avvicina all'apice.

Gli elementi strutturali presenti a livello della polpa dentale sono cellule connettivali (in prevalenza fibroblasti), cellule mesenchimali indifferenziate, istiociti, macrofagi. Si ritrovano anche fibre collagene di tipo I e III, le quali aumentano nel paziente anziano. La sostanza fondamentale è costituita da proteoglicani e fibronectina.

La polpa è riccamente vascolarizzata ed innervata. Le arteriole e le venule raggiungono o abbandonano la polpa attraverso il forame apicale ed alcuni canali accessori presenti a livello della radice. I vasi sono assimilabili a quelli che si trovano in ogni altro tessuto connettivo, differiscono solo nel fatto che la loro parete vascolare è sottile in rapporto al diametro del lume e può presentare delle discontinuità.

La polpa è suddivisa in due strati: una zona odontoplastica e una zona acellulare ricca di sostanza fondamentale, vasi e nervi.

L'innervazione è rappresentata oltre che da fibre amieliniche del sistema nervoso autonomo, anche da fibre nervose somatiche afferenti responsabili delle sensazioni dolorifiche, che sono di due tipi: mieliniche di tipo A- δ (diramazioni trigeminali del plesso subodontoplastico) ed amieliniche di tipo C (simpatiche post-gangliari).

Il cemento

Il cemento è un tessuto connettivo non vascolarizzato simile all'osso, questo ricopre la radice del dente e funge principalmente da organo di congiunzione tra dente e osso alveolare per mezzo del legamento parodontale. Esso si può distinguere in cemento cellulare e in cemento acellulare, e presenta uno spessore

irregolare che tende ad aumentare in profondità, raggiungendo un valore compreso tra 100-150 μm , mentre a livello del colletto solitamente è circa 10 μm .

Il cemento è il tessuto che ricopre la dentina radicolare, esso raramente si estende oltre il margine cervicale dello smalto. Tale zona viene definita come giunzione amelo-cementizia.

Fra i tessuti duri del dente il cemento è il più tenero, facilmente soggetto ad usura da parte dell'azione abrasiva dello spazzolamento e dello sfregamento del cibo durante la masticazione. Il suo principale ruolo consiste nel provvedere ad un solido ancoraggio per le fibre del legamento parodontale, assicurando pertanto la connessione fra il dente e le pareti dell'alveolo. È quindi uno dei componenti del parodonto.

Fra i tessuti dentari è quello che più assomiglia all'osso sebbene, al contrario di quest'ultimo, non abbia una vascolarizzazione propria e dipenda dal legamento parodontale per i processi nutrizionali. Inoltre, il cemento non possiede innervazione. Istologicamente sono state descritte due differenti forme di cemento: cellulare e acellulare.

Il cemento acellulare viene formato e posizionato attorno alla dentina: nel terzo apicale della radice risulta coperto dal cemento cellulare nel quale si trovano cellule incorporate, i cementociti, all'interno di lacune collegate da canalicoli.

Più recentemente, il cemento è stato riclassificato in base all'origine delle fibre di collagene presenti nella matrice. Possiamo parlare di cemento con fibre intrinseche (con fibre collagene depositate dai cementoblasti) e cemento con fibre estrinseche (con fibre che derivano dal legamento parodontale).

Il cemento acellulare si forma inizialmente come cemento con fibre estrinseche e strati depositi successivamente possono contenere fibre o estrinseche o intrinseche, mentre il primo cemento cellulare ha solo fibre intrinseche e gli strati prodotti più tardi possiedono fibre intrinseche ed estrinseche.

Esistono pochi dati circa la composizione del cemento, probabilmente perché esso forma uno strato estremamente sottile, dell'ordine di 20-50 μm al colletto del dente, ovvero nella regione cervicale sotto la giunzione amelo-cementizia, per raggiungere uno spessore massimo 200 μm all'apice della radice. Inoltre, la densità del cemento è molto simile a quella della dentina, dalla quale è

estremamente difficile separarlo. Circa il 70% del peso del cemento (il 47% del volume) è costituito da materiale inorganico, rappresentato principalmente da idrossiapatite (con cristalli di dimensioni simili a quelli della dentina) e fluoro. Il contenuto di materiale organico (collagene di tipo I) del cemento rappresenta circa il 20% in peso (il 30% in volume), con una composizione più vicina a quella della dentina per il cemento acellulare e a quella dell'osso per il cemento cellulare.

1.2 Microbiologia del cavo orale

Nel neonato la cavità orale è una struttura sterile, viene contaminata durante la nascita. Durante questo evento e nei primi giorni di vita, in cui avviene l'allattamento, diversi microorganismi colonizzano la bocca del neonato. All'inizio della colonizzazione del cavo orale prevale lo Streptococco, si riscontrano sulle mucose *S. mitis*, *S. oralis* e *S. salivarius*; solo dopo l'eruzione dentale comparirà lo *Streptococcus mutans*.

Molti studi dimostrano che la contaminazione da parte di batteri cariogeni, tra cui il *S. Mutans*, avviene per trasmissione verticale in particolare, nei 60% dei casi, avviene da parte della madre.

Dopo l'eruzione dentale si viene a formare la così detta pellicola acquisita, che è definita come un "*sottile strato (0.1-0.7 μm) acellulare di glicoproteine di derivazione salivare che si forma in pochi minuti*" (Lindhe); questa, priva di batteri, è da considerarsi fisiologica. Le glicoproteine salivari sono ricche in amminoacidi che molto probabilmente stabiliscono legami di tipo elettrostatico con la superficie dello smalto.

Nel cavo orale di un individuo sano sono presenti:

- Batteri cocchi Gram positivi, aerobi facoltativi, con una prevalenza del 28-46%; gran parte di questi sono streptococchi, tra questi la presenza del *S. Mutans* è variabile nella placca (0-50%).
- Batteri Gram positivi aerobi facoltativi, si trovano soprattutto nella placca (23,8%)
- Cocchi e bastoncelli Gram positivi e Gram negativi anaerobi (4-20%)

-
- I cocchi e i bastoncelli Gram- aerobi facoltativi sono presenti ma scarsi (0,4 -3,4 %)

Sulle superfici dei denti sani si presentano in maniera preponderante: Streptococchi (in particolare, Sanguinis e Gordonii), Rothia, dentocariosa, Gemella (Hemolysans e Adiacens), Actinomyces e Abiotrophia defectiva, specie evidentemente più affini alle superfici dure.

Il biofilm batterico

Il biofilm batterico è responsabile delle malattie a carico del cavo orale, questo è definito: *“Un insieme di comunità di microrganismi presenti sulle superficie del dente quale biofilm immerso in una matrice di polimeri originati dall’ospite e da microbi”*. La formazione del biofilm è data da diversi fattori: cattivo spazzolamento/ igiene orale domiciliare, dieta a base di zuccheri, fumo, diabete, assunzione quotidiana di farmaci, xerostomia etc...

La formazione e l’evoluzione del biofilm dentale sopra gengivale possono essere descritte in due periodi fondamentali. Il primo, dalle 2 alle 8 ore, che consiste nell’ adesione di primitivi batteri colonizzatori ai componenti tissutali dell’ospite, ossia alla pellicola acquisita o, eventualmente, a superfici di smalto libere. Il secondo stadio, più lungo e complesso, che consiste a sua volta di due momenti: il primo momento è una evoluzione tempo-dipendente (in 8-48 ore) di cluster multi stratificati di cellule batteriche immerse in una matrice di costituenti batterici e dell’ospite definita come “placca giovane”; il secondo stadio consiste nella costituzione, in 2-9 giorni e oltre, di un biofilm dentale maturo (placca matura), stabile anche se in continuo rimaneggiamento e che viene anche definito “comunità apicale”.

Colonizzazione iniziale

I primi colonizzatori includono batteri che sono in grado di aderire alla pellicola acquisita mediante interazioni molecolari sia aspecifiche che specifiche.

Per le forze aspecifiche consideriamo:

- Forze chimico-fisiche di base e le forze orali di distacco. Per le prime si intendono le forze a largo raggio, come per esempio le forze di Wan der

Waals, forze elettrostatiche, legami a idrogeno, costituiscono una rete costante di attrazione, o repulsione. Le forze orali di distacco sono scarse o nulle durante il sonno, mentre aumentano, sino a superare quelle adesive, durante la fonazione, la masticazione e la deglutizione.

- Idrofobicità o idrofilicità del substrato ed energia di superficie batterica. È stato ampiamente dimostrato che le specie batteriche ad alta energia di superficie sono, nello stesso tempo quelle che si trovano in maggioranza nel cavo orale e quelle che aderiscono a substrati idrofili.
- Modalità di interazione interbatteriche. Tra queste consideriamo in primis la coaggregazione, definita come *“l’interazione tra due microrganismi di ceppo o specie differenti entrambi in sospensione o in situazione planctonica”*. Consideriamo anche la coadesione, definita come *“l’interazione tra un microrganismo aderente, sessile, e un microrganismo, di ceppo o specie differente, in situazione planctonica”*

Le interazioni specifiche vengono invece effettuate da così dette “adesine” che si rapportano con i recettori della superficie del substrato, rappresentati principalmente dalle macromolecole salivari adsorbite nella pellicola acquisita.

L’adesione tra i colonizzatori primitivi sulla pellicola acquisita dipende da molti fattori, tra cui le variazioni ambientali (pH, pressione parziale di O₂ o di CO₂, elettronegatività ecc...), sinergismi batterici, antagonismi batterici, competizioni tra batteri per sostanze nutrienti.

Diversi studi dimostrano che i primi colonizzatori sono alcuni streptococchi orali, in particolare appartenenti al gruppo viridans, veionelle ed alcuni actinomiceti (in particolare *A. naeslundii*).

Gli ‘streptococchi viridans’ sono un eterogeneo gruppo di batteri “pionieri”, numericamente abbondante nella placca umana giovane, tanto da comporre più dell’ottanta per cento della placca iniziale. Tra questi, i più veloci a colonizzare lo smalto e numericamente preminenti nella placca iniziale, vi sono lo *S. mitis* (oralis), *S. sanguinis*, *S. Gordonii*. Le Veionelle, in particolare *V. parvula* e *V. dyspar*, costituiscono più del 5% della massa della placca iniziale umana, ma, a differenza degli streptococchi, non sono in grado di catabolizzare gli zuccheri e dipendono per i loro processi fermentativi dalla presenza di acidi organici come

l'acido propionico (contenuto nei formaggi, nel pane etc...), di acido acetico, di biossido di carbonio e di idrogeno. Tra le specie pioniere vi è anche l'*A. naeslundii*, presente sia nel cavo orale in condizioni di salute e sia durante la maturazione della placca.

I batteri pionieri sono quindi fondamentali per le loro capacità di creare rapporti ed interazioni con la pellicola acquisita e tra di loro, tramite interazioni aspecifiche e specifiche, e in particolare sono in grado di creare interazioni con batteri di altro tipo.

Shift batterico

Con il passare del tempo si verrà a creare la così detta “placca giovane”, in circa 24 – 48 ore; il processo generale consiste nella variazione quali-quantitativa delle specie microbiche, presenti e nella evoluzione del biofilm, in masse multi-stratificate ed organizzate di batteri in replicazione immersi in una matrice di origine mista batterica/ospite; questa continua in maniera abbastanza rapida sino alla costituzione di un biofilm dentale maturo. Dalla placca giovane alla placca matura si osserva un cambio della colonizzazione batterica, ovvero, nel primo giorno di colonizzazione la popolazione batterica è formata principalmente da microrganismi aerobi facoltativi appartenenti al genere *Streptococco* (*S. Mitis*, *S. Rothia*, *S. Mutans*) e aerobi appartenenti ai generi *Neisseria* e *Nocardia* (*Rothia*). Nei giorni successivi si verifica un evidente shift e, le proporzioni di questi ultimi microrganismi, decrescono mentre aumentano le proporzioni di altri microaerofili, ovvero *Actinomiceti* e *Corinebatteri*, e di anaerobi quali *Veillonelle* e *Fusobatteri*. Questi cambiamenti avvengono per diversi tipi di interazioni interspecie:

- Le variazioni ambientali generate dalle specie pioniere causano condizioni predisponenti alla colonizzazione o all'evidenziarsi numerico di batteri più esigenti rispetto alle richieste atmosferiche: *“L'ossigeno viene consumato dalle specie batteriche aerobie e microaerofile (diminuzione della pO₂) e sostituito da anidride carbonica (aumento pCO₂) e da altri gas generati quali prodotti terminali del metabolismo batterico. Gradualmente, anche il potenziale di ossidoriduzione si abbassa (diminuzione dell'Eh), favorendo la crescita di specie anaerobie obbligate”*

-
- Sinergismi: oltre la coadesione vi sono da tenere in conto lo scambio di nutrienti, le attività complementari nell'idrolisi di macromolecole, gli aiuti nella difesa contro fattori antibatterici dell'ospite.
 - Competizione per nutrienti, fattori di crescita e spazio secondo le regole fondamentali della Microbiologia
 - Antagonismo: con avvelenamento tramite metaboliti primari (enzimi degradativi) o secondari (come le batteriocine) o produzione attiva di O₂ sfavorevole agli anaerobi.
 - Trasferimento di materiale genetico (gene transfer) tra batteri. È stata dimostrata la capacità dei batteri di trasferire DNA tra specie simili ("gene transfer") e/o tra specie diverse ("lateral" o "horizontal gene transfer"). L'abilità di trasferire DNA e di assumere DNA estraneo ("genetic competence") sono essenziali per lo scambio di materiale genetico ed è probabile che, in assoluto, il transfer di geni tra specie giochi un ruolo importante nell'evoluzione batterica.

Regolazione dell'espressione genica da parte del biofilm e presenza di sistemi di comunicazione cellula-cellula ("quorum sensing"). Diversi studi confermano che l'espressione genica durante i vari stadi della formazione del biofilm è regolata attraverso vari sistemi di trasduzione del segnale che producono reazioni a cascata, conducendo o all'induzione o alla inibizione della trascrizione genica. Lo stimolo esterno è spesso legato all'ambiente anche se non tutte le molecole coinvolte sono note. I sistemi di segnalazione più noti e studiati sono quelli detti "quorum sensing", che vengono attivati come risposta alla densità batterica. Questi sistemi sono presenti sia in batteri Gram + che in Gram-, hanno molecole segnalatrici, dette autoinduttori ("AutoInducers", AI), attive intraspecie, che vengono prodotte in quantità costante e la cui concentrazione è, quindi, funzione della densità microbica. Il termine quorum è usato per descrivere il fatto che un certo numero di microrganismi deve essere presente perché il segnale possa essere percepito, trasmesso e desti una risposta. I batteri, chiusi nel biofilm o a contatto con una superficie, rilasciano costantemente le molecole segnale, facendone aumentare la concentrazione nell'area tra microrganismi/microrganismi o microrganismi/superficie a causa della

diffusione limitata. I microrganismi percepiranno tale aumento di concentrazione e attiveranno le espressioni fenotipiche più opportune.

Organizzazione del biofilm

A questo punto si comincia a formare la placca matura, o comunità apicale, che si presenta con una modalità di crescita ordinata.

A partire dalla metà degli anni '60 l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione e a trasmissione ha offerto nuovi dati precisando: la disposizione generale dei microrganismi nello spessore della placca, la presenza dei classici tipi morfologici batterici (cocchi, bastoncelli, filamenti e spirochete).

Trattando della placca sopragengivale matura presente sulle superfici lisce, Newbrun (1989) basandosi sulle metodiche microelettroniche ha proposto una classificazione in 4 strati che comprendono:

1. Interfaccia placca/dente - Rappresentata essenzialmente dalla pellicola acquisita il cui spessore massimo può raggiungere i 10 micron, ma che può essere anche più sottile o, in alcuni punti, assente.
2. Strato batterico condensato – è rappresentato da uno strato di cocchi addensati in microcolonie colonnari a crescita ortogonale all'interfaccia placca/dente con spessori da 3 a 20 cellule. Tale disposizione è stata paragonata a quella di “grattacieli in città affollate”.
3. Corpo della placca – È la porzione maggiore del biofilm orale, è meno compatta della precedente ed è costituita da tipi batterici diversi, raccolti in microcolonie a collocazione apparentemente casuale ma a crescita, comunque, tendenzialmente verticale. Unico segno costante è la disposizione dei filamenti che tendono a disporsi ortogonalmente alla superficie smaltea con una disposizione “a palizzata”.
4. Superficie esterna della placca – Ha una disposizione ancora meno compatta e riconosce essenzialmente la presenza di cocchi e bastoncelli. Caratteristica è la presenza nella placca che si avvia alla maturità (7/9 giorni) delle formazioni dette “corn-cob” o a “pannocchia di granoturco”, costituite da un filamento centrale cui sono coadesi numerosi cocchi.

Dopo alcuni lavori pionieristici con CLSM sul biofilm dentale

hanno proposto la combinazione della m. confocale con la tecnica di fluorescenza vitale ottenendo interessanti risultati preliminari, ampliati e confermati dalla letteratura successiva.

Nel corso degli anni la struttura è stata analizzata ulteriormente, da tale letteratura si può evincere che, per quanto riguarda il biofilm maturo:

- la placca sopragengivale ha un'architettura decisamente più lassa ed aperta di quanto suggerito dalla microscopia elettronica;

- sono presenti, nel contesto della placca, zone di vuoto a distribuzione irregolare (probabilmente occupate in vivo da polisaccaridi e glicoproteine) nonché canali d'acqua (water channels) che attraversano il biofilm dalla superficie esterna sino allo smalto. Tali vuoti sono circondati da cellule vive che quindi contraggono un rapporto intermediato da fluido sia con l'esterno che con la superficie del dente

- il biofilm sarebbe, in realtà, costituito da ampie zone di cellule morte oltre che da cellule vive. Più precisamente: la quota aderente allo smalto sembra costituita in massima parte da uno strato di microrganismi morti, principalmente cocci; la percentuale di cellule vitali cresce progressivamente in prossimità delle zone centrali; la periferia sarebbe caratterizzata nuovamente da strati di cellule morte. Questa distribuzione spaziale può avere conseguenze importanti:

- lo strato non vitale aderente alla superficie smaltea fungerebbe da vero e proprio ancoraggio e appoggio per gli strati sovrastanti;

- lo strato più esterno si comporterebbe come uno scudo protettivo nei confronti di fattori del sistema immunitario dell'ospite e di disturbo in genere.

- Il tasso di crescita del biofilm maturo è bassissimo per un'effettiva carenza di spazio e per l'utilizzo dei nutrienti e dell'energia finalizzato in massima parte alla sintesi di polisaccaridi extracellulari.

- i "water channel" ed i vuoti permetterebbero a molte sostanze di giungere a batteri siti in profondità e ai prodotti di questi di diffondere verso l'esterno o verso la superficie di contatto placca /dente-

La matrice

La placca matura è costituita per l'80% di acqua e per il 20% di sostanze solide. Eliminando l'acqua e considerando il solo 20% rappresentato dal peso secco, quest'ultimo riconosce come le proteine tra il 40 ed il 50%, lipidi tra il 10 ed il 14

% e carboidrati tra il 13 ed il 18 %, con ampie variazioni al rialzo in base ai carboidrati presenti nella dieta. Le proteine sono in quantità decisamente superiori a quelle estraibili da un peso equivalente di microrganismi e, quindi, deriveranno in parte (circa 1/3) dai batteri ed avranno localizzazione intracellulare e per i 2/3 rimanenti da altre fonti e, in particolare, dalle glicoproteine della saliva e del fluido creviculare private, ad opera di enzimi batterici della componente glucidica, ed avranno localizzazione extracellulare.

Anche i lipidi eccedono le quantità riscontrabili nei comuni microrganismi orali ed hanno quindi parziale localizzazione extracellulare, ma per essi occorre considerare anche l'alto contenuto di lipopolisaccaridi presente in batteri Gram-anaerobi, come Veillonelle e Fusobatteri.

La componente carboidratica del biofilm risulta, infine, costituita da polisaccaridi intracellulari (IPS) e da polisaccaridi extracellulari (EPS) : i primi sono utilizzati come sorgente endogena di carboidrati, che può essere metabolizzata dai batteri nei periodi di limitazione di nutrienti; gli EPS possono favorire l'accumulo batterico sulla superficie dentale ed influenzare in vari modi le proprietà fisiche e biochimiche del biofilm.

Da quanto detto si può quindi affermare che il biofilm dentale risulta costituito, oltre che da batteri ed acqua, anche da una sostanza interbatterica complessa denominata "matrice" della placca, nella quale si presenta, quale scheletro di sostegno, una fitta trama tridimensionale di polimeri polisaccaridici che ospita, oltre ai corpi batterici e ai cluster cellulari, glicoproteine e fosfolipidi.

S. Mutans

Lo S. Mutans è stato individuato nel 1924 per la prima volta da J. Clarke, questo battere ha ricevuto moltissima attenzione dalla comunità scientifica a partire dagli anni Cinquanta per il suo coinvolgimento nel processo carioso. L'habitat naturale di questo battere è la cavità orale dell'essere umano, in particolare, come già visto, nella placca umana. Questo agente ha potenziale cariogeno, e ciò è dovuto a tre principali fattori:

- La sua abilità di sintetizzare grandi quantità di EPS di glucosio, partendo dal saccarosio, che aiutano la colonizzazione delle superfici dure del dente e lo sviluppo della matrice extracellulare del biofilm

-
- L'abilità di trasportare e metabolizzare una vasta gamma di carboidrati, trasformandoli in acidi organici
 - L'abilità di sopravvivere a stress ambientali del cavo orale, in particolare, la sua abilità di resistenza al pH acido

Questo battere non è il l'unico agente eziologico della carie; tuttavia, diversi studi dimostrano che esso può alterare l'ambiente del cavo orale attraverso la produzione di una miscela ricca di EPS molto acida, creando nicchie favorevoli alla proliferazione di altri batteri acido-resistenti e che a loro volta producono sostanze acide.

Questo battere è coinvolto anche nell'esordio di endocardite batterica, che è una infiammazione delle valvole del cuore che può essere fatale.

1.3 La carie

La carie è una delle malattie croniche più comuni a livello globale, e può colpire l'individuo in qualsiasi stadio della sua vita. Si stima che circa 3.1 miliardi di persone ne soffrano, pari al 44 % della popolazione globale, percentuale maggiormente distribuita tra i paesi meno industrializzati e in famiglie di ceto sociale basso. Nonostante questa malattia sia facilmente prevenibile, la sua prevalenza è diminuita solo negli ultimi 30 anni nei paesi più industrializzati. Questo miglioramento, anche se solo recente, è dato da diversi fattori, tra cui la fluorizzazione dell'acqua, l'uso di fluoro nei dentifrici, un miglioramento generale della dieta e, in particolare, l'educazione riguardante la salute del cavo orale.

I vari tessuti del cavo orale creano diverse nicchie che permettono la proliferazione di microrganismi. Durante la crescita si hanno diversi cambiamenti di abitudini, cambiamenti ormonali e di alimentazione e ciò influisce anche sul bioma all'interno della bocca. Condizioni come la temperatura, ossigeno, presenza di nutrienti, livelli di pH, hanno un grande impatto sulla composizione del biofilm presente nelle diverse zone della bocca.

Un elemento fondamentale all'interno del cavo orale è la saliva: una secrezione delle ghiandole salivari ricca di *molecole attive*.

Tra le molecole attive possiamo trovare diverse proteine, ad esempio:

-
- Lisozima, che causa la batteriolisi dei batteri
 - Lattoferrina, la quale inibisce la crescita dei batteri
 - Lattoperossidasi, che blocca il metabolismo del glucosio
 - Altre molecole che appartengono al sistema immunitario (per esempio mucine, immunoglobuline di tipo A, G, M e altre glicoproteine)

La saliva inoltre contribuisce alla rimozione meccanica dei batteri dalle superfici colonizzate assieme alla masticazione, ed è responsabile del processo di remineralizzazione del dente. Una alta secrezione di saliva aiuta a ridurre il tempo di esposizione dello smalto a sostanze acide e accelera l'effetto tampone all'interno della bocca dopo un pasto. In questo modo tiene sotto controllo gli sbalzi di pH dati dal biofilm batterico, e assicura l'integrità della componente minerale dello smalto. Questa, tuttavia, permette anche il trasporto di nutrienti che danno vita al biofilm batterico, poiché trasporta peptidi e carboidrati, la cui quantità determinerà la quantità e la qualità dei microrganismi del cavo orale. La saliva inoltre contiene glicoproteine ricche di prolina, sostanze che fungono da recettori e che permettono l'adesione batterica alla pellicola acquisita.

Processo carioso

La fisiopatologia della carie è multifattoriale. I tessuti duri del dente sono esposti nella cavità orale e sono il target della malattia, suscettibili in qualsiasi zona del dente. Tuttavia, lo sviluppo della malattia non si manifesta senza la presenza di biofilm batterico e l'esposizione frequente, data dalla dieta, a sostanze zuccherate. La carie può essere al meglio descritta come una malattia che si collega a comportamenti che coinvolgono una dieta ricca di carboidrati fermentabili (ovvero glucosio, saccarosio, maltosio), una cattiva igiene orale in combinazione con una inadeguata fluoroprofilassi.

La carie tendenzialmente inizia al di sotto dello strato di smalto, ed è il risultato di un processo nel quale la struttura cristallina del dente è demineralizzata da acidi organici, prodotti da batteri appartenenti al biofilm orale, attraverso la fermentazione di carboidrati primari. Questi ultimi possono produrre una vasta gamma di acidi, quello che predomina è l'acido lattico, dato dal metabolismo del glucosio. Nella fase liquida del biofilm gli acidi si accumulano all'interno della bocca determinando un abbassamento del pH, questo fa sì che l'interfaccia

presente tra il biofilm e lo smalto diventi insaturo e gli acidi cominceranno a demineralizzare i cristalli di idrossiapatite, determinando una demineralizzazione parziale del dente. La perdita di questi cristalli aumenta la porosità del dente, aumentando gli spazi tra essi nella struttura dello smalto e rendendo la superficie meno dura, ciò permette agli acidi di scendere più in profondità all'interno del dente, andando a creare una demineralizzazione al di sotto dello strato di smalto dentale. In questo stadio iniziale ci sono diversi fattori che possono fermare il processo carioso, in particolare grazie all'azione di ioni di fluoro, calcio e l'effetto tampone della saliva. Dopo l'ingestione degli zuccheri la saliva aiuta a tamponare l'ambiente acido della bocca, mentre gli ioni di calcio, fosfato e fluoro favoriscono l'apposizione di minerali, favorendo la remineralizzazione dello smalto. La demineralizzazione può continuare più in profondità, causando quindi una lesione sotto lo strato di smalto, che clinicamente è nota come "white spot"; questa può essere fermata applicando misure preventive; tuttavia, l'azione riparativa spesso non penetra in profondità, dando una risoluzione della lesione solo nello strato più superficiale. Se il processo carioso prosegue ci sarà un aumento della porosità superficiale fino al formarsi di microcavitazioni sullo smalto dentale, questa potrà poi continuare prima fino alla dentina e poi arrivare alla polpa dentale.

La relazione sinergica presente tra i batteri del microbiota orale è dinamica e può essere perturbata dal cambiamento di abitudini o della biologia del cavo orale; questi cambiamenti possono predisporre allo sviluppo di malattie. I fattori di rischio per lo sviluppo della patologia cariosa comprende l'assunzione frequente di cibi zuccherati facilmente fermentabili dai batteri e/o una salivazione ridotta. Diversi studi in passato hanno riscontrato una presenza maggiore di *Streptococcus Mutans* e di *S. sobrinus* nelle regioni cariate in confronto a porzioni di smalto intatto; i lattobacilli erano isolati dalla lesione. Queste osservazioni portarono all'idea che la carie fosse causata da una cerchia ristretta di batteri che potevano essere presenti all'interno del biofilm, questa teoria è detta "specific plaque hypothesis". Studi successivi dimostrarono la presenza di carie in siti dove questi batteri erano assenti. Diversi studi di laboratorio confermarono che i batteri presenti nel biofilm, diversi da quelli citati sopra, potevano generare un ambiente acido attraverso il metabolismo del glucosio, mentre altri batteri potevano ridurre

gli effetti dannosi dell'acido lattico utilizzandolo come una fonte nutrizionale convertendolo in un acido meno potente. Questo portò all'ipotesi detta "non specific plaque hypothesis", che sostiene che la carie è il prodotto del biofilm batterico. Altri studi hanno trovato l'associazione tra carie e la presenza di batteri che tollerano l'ambiente acido della bocca, in particolare Bifidobacterium, Actinomyces, Propionibacterium. Grazie a questi studi si portò avanti la teoria che l'agente eziologico della carie non può essere considerato solo uno, non ci si può approcciare a questa malattia con il pensiero "un ente una malattia" perché è una malattia la cui progressione è data da molteplici fattori, non solo la presenza di batteri che producono acidi. Questa teoria è detta "ecological plaque hypothesis" e sostiene che diversi microrganismi presenti nel biofilm possono favorire l'insorgere della carie, tuttavia si presentano come non attivi, e non rilevanti a livello clinico. La carie è una conseguenza di uno shift nell'equilibrio della microflora batterica causata da fattori ambientali. La regolare esposizione della placca a zuccheri facilmente fermentabili in condizioni di pH acido persistente, favorirà la crescita nel biofilm di batteri acido resistenti mentre bloccherà la crescita di batteri che crescono in condizioni di pH neutro.

Secondo questa teoria quindi questa malattia può essere tenuta sotto controllo non solo dall'inibizione di batteri che producono sostanze acide, ma anche andando ad interferire sui fattori che causano la disbiosi nel microbiota orale, attraverso la riduzione degli zuccheri nella dieta per prevenire condizioni di acidità nella bocca, o magari attraverso la consumazione di snack che hanno al loro interno zuccheri alternativi che non possono essere metabolizzati in acidi dai batteri del cavo orale.

Carie in età pediatrica

La presenza di ECC è definita dalla presenza di superfici cariate nei denti entro i primi tre anni di vita. La American Association of Pediatric Dentistry definisce la presenza di una superficie cariata, curata o mancante per carie, entro i primi 71 mesi di vita, come Severe childhood caries, la stessa definizione è data dalla presenza di carie sulle superfici degli incisivi anteriori tra i 3 e 5 anni.

La ECC è la malattia cronica più comune nei pazienti pediatrici a livello globale, la cui prevalenza è soprattutto nei bambini di famiglie non abbienti, svantaggiate a livello sociale, e appartenenti a minoranze. La percentuale di popolazione che

soffre di ECC fluttua tra il 12% e il 27% tra i bambini in età compresa tra i 2-3 anni; la percentuale aumenta nei bambini tra i 4 e i 6 anni, in cui le carie infantili hanno una prevalenza tra il 27% e 48%, con più del 76% della presenza nei paesi dell'Est.

Le carie infantili sono caratterizzate dalla presenza di 1 o più denti cariati, mancanti o già trattati nella dentizione decidua, il quale ciclo eruttivo inizia a circa 6 mesi, con l'eruzione degli incisivi centrali inferiori, e che si completa circa a 3 anni.

La manifestazione delle ECC è data dalla cavitazione dei 4 incisivi mandibolari con il coinvolgimento o meno dei primi molari mandibolari, in quanto questi, sono i primi ad essere esposti a sostanze zuccherine tra cui il latte ingerito in età infantile. (latte materno/formula). Solitamente la lesione cariosa che coinvolge i primi molari parte dalla superficie oclusale e poi si distribuisce nelle superfici mesiali e/o distali del dente. Se la carie non viene trattata la manifestazione cariosa procede velocemente, distruggendo i tessuti della dentizione decidua, può dare pulpiti e manifestazioni a livello sistemico. Anche dopo il trattamento, i pazienti pediatrici rimangono ad alto rischio di sviluppare altre patologie cariose, risultando in un peso economico per famiglie che non possono permetterselo.

Fattori di rischio

Presenza di *S. Mutans*

Come già citato nel capitolo precedente, le carie hanno eziologia multifattoriale, dipendente soprattutto dalla presenza di una disbiosi all'interno del biofilm batterico. Le ECC sono una forma aggressiva di carie caratterizzata dalla presenza di *Streptococcus mutans*, che a volte può formare fino al 30% della placca del paziente affetto. La presenza di SM dipende dallo stadio della carie, e anche altri microrganismi possono essere associati allo sviluppo della malattia. Gli zuccheri introdotti con la dieta sono i principali mediatori della patogenesi della carie infantile. Tra questi il più cariogeno è il saccarosio, in quanto funziona da substrato per la produzione di acidi e di EPS da parte di microrganismi che facilitano l'inizio e la progressione della formazione di biofilm batterico.

Abitudini errate

Alcune abitudini che possono facilitare lo sviluppo di ECC sono, per esempio, l'ingestione di molte sostanze zuccherate, spesso attraverso l'ingestione continua di bevande zuccherate dal biberon durante il giorno o la notte. Questo tipo di abitudine risulta essere presente sia nei bambini con carie negli incisivi anteriori mascellari sia nei bambini con carie in altri siti. Ci sono abbastanza studi che possono confermare che l'utilizzo del biberon oltre i 12 mesi del bambino è un grosso fattore di rischio per l'insorgenza di carie. E' stato dimostrato che nei bambini che i bambini con carie eliminano la bottiglia circa 4-7 mesi più tardi in confronto ai bambini caries free.

Igiene orale

Le carie nei denti decidui si manifestano su superfici facilmente detergibili; perciò, la presenza di carie si deve associare al livello di igiene orale del bambino. Una buona igiene orale è associata alla presenza di meno carie.

Maturazione e difetti del dente

La superficie del dente è più suscettibile alla carie subito dopo l'eruzione e prima che questa maturi. Di conseguenza i bambini presentano un ambiente perfetto per lo sviluppo della carie: denti erotti recentemente, cavo orale colonizzato da flora batterica cariogena, ingestione frequente di zuccheri fermentabili. Inoltre, il rischio aumenta nel caso in cui siano presenti difetti dello smalto.

Manovre di prevenzione

Dieta

Il principale motivo di disbiosi è l'eccessivo consumo di zuccheri facilmente fermentabili. In una dieta equilibrata, o comunque bassa di zuccheri, i batteri metabolizzano effettivamente gli zuccheri producendo acidi; tuttavia, il pH viene subito stabilizzato dai meccanismi fisiologici della bocca. L'organizzazione mondiale della sanità consiglia fortemente di limitare il proprio apporto di zuccheri a meno del 10% della nostra dieta, così da limitare il numero di carie e di prevenire l'obesità. Ciò corrisponde a meno di circa 50 grammi al giorno di zuccheri. Gli zuccheri possono essere monosaccaridi o disaccaridi, solitamente

sono aggiunti a bevande e negli alimenti dai manifatturieri, da cuochi o dal consumatore stesso. Ci sono altri studi che consigliano una riduzione nell'assunzione di zuccheri pari al 5% della dieta, con questa percentuale infatti si suppone che la manifestazione delle lesioni cariose sia quasi inesistente, anche con la totale assenza di fluoro. Dalla tipologia di alimenti attraverso cui gli zuccheri vengono ingeriti, dipende quanto questi rimarranno adesi alla superficie del dente. Le bevande zuccherate attraversano il cavo orale molto velocemente, e hanno poco contatto con le superfici del dente; tuttavia, se una bevanda viene consumata molto spesso, o se viene ritenuta all'interno della bocca, il rischio di carie aumenta. Mangiando caramelle, mentine o lecca-lecca, questi rimangono all'interno della bocca per un periodo prolungato, aumentando il tempo di demineralizzazione dentale. Inoltre, cibi appiccicosi come patatine fritte, caramelle gommosi etc... devono essere evitati, in quanto aderiscono molto facilmente alla superficie del dente.

Igiene orale

Ci sono molte cose che influenzano l'igiene orale di una persona: ambiente, età, il fumo, e ciò determina i cambi che possono dare una disbiosi a livello del cavo orale. Una rimozione meccanica regolare nel tempo è considerata fondamentale come misura di prevenzione per la carie e per mantenere un biofilm equilibrato, cosa che preverrà il formarsi di nicchie di batteri ritentori di placca. La flora batterica cambia dopo lo spazzolamento, una buona igiene orale si mantiene lavando almeno due volte al giorno la bocca, in quanto questo aiuterà a mantenere la carica batterica non nociva. Bisogna sottolineare, tuttavia, che le manovre di igiene orale domiciliare non sempre sono efficaci senza l'intervento ulteriore della fluoroprofilassi.

Fluoroprofilassi

Il fluoro si aggrega nella placca sotto forma di ioni di fluoro provenienti da saliva, acqua, dentifrici, collutori e paste applicate professionalmente. Una piccola parte della placca non viene rimossa dall'igiene quotidiana, e questa diventa un reservoir per il fluoro per promuovere la remineralizzazione della superficie del dente. Le applicazioni professionali topiche di fluoro, come per esempio l'applicazione sotto forma di gel, combinano gli ioni di fluoro con quelli di calcio

presenti nella placca dentale andando a creare fluoruro di calcio, che si degrada più lentamente nell'ambiente acido creato dai batteri. Ciò accade grazie alla presenza di fosfato e/o la presenza della pellicola dagli ioni di fluoruro di calcio, che rilasciano ioni di fluoro per lunghi periodi di tempo. Inoltre, l'azione del fluoro a livello della dentina ha la capacità di inibire o rallentare la progressione della patologia cariosa penetrata nel tessuto.

Ci sono diversi metodi per somministrare fluoro. Un esempio, per i bambini oltre i 6 anni, l'utilizzo di un collutorio non alcolico a base di fluoro si è rilevato efficace nella prevenzione della carie nei denti permanenti. La dose consigliata nell'ausilio, per evitare effetti collaterali, è una concentrazione nel collutorio pari a 900 ppm (10 ml contengono quindi 9 ppm), dieci volte meno della dose considerata tossica per un bambino di circa 20 kg.

Un altro metodo molto utilizzato è l'implementazione di supplementi a base di fluoro. È stato dimostrato che l'utilizzo di pastiglie o gocce di fluoro riduce l'incidenza di carie nei denti permanenti, rispettando però le dosi prescritte. Tale metodo di prevenzione è sconsigliato per i bambini sotto i 6 mesi, ovvero edentuli, o per bambini che assumono già fluoro per via sistemica, per fluorizzazione dell'acqua, che ingeriscono una quantità pari a 0,6 mg/l di fluoro. In caso in cui l'implementazione di fluoro non avvenga attraverso riserve di acqua, è consigliato:

- Nessuna implementazione quando il bambino è ancora edentulo.
- Dalla comparsa del primo dente a circa 3 anni sono consigliati 0,25 mg/l di fluoro al giorno.
- Tra i 3 e i 6 anni 0,50 mg/l di fluoro per giorno
- Dai 6 ai 16 anni 0,5 mg di fluoro al giorno

I dentifrici a base di fluoro sono ormai un must per la prevenzione della carie. Si è dimostrato che la dose più efficace è di 1500 ppm. Si consiglia l'applicazione del dentifricio da parte dei genitori, per i bambini più piccoli è sufficiente una striscia di dentifricio per i bambini sotto i 3 anni, mentre si consiglia la grandezza di un chicco di riso di dentifricio per i bambini oltre i 3 anni. Il dentifricio dovrebbe essere sputato dopo l'uso, senza però fare sciacqui successivi.

Le applicazioni professionali di fluoro sono molto adottate nel campo per aiutare la prevenzione della carie nei pazienti di diverse età. L'applicazione di gel è

risultata essere efficace contro la comparsa di carie sia nei denti permanenti che nei denti decidui.

1.3 Il fumo

In questo studio sono stati prese in considerazione diversi metodi per l'assunzione di tabacco, in particolare concentrandosi sull'assunzione di tipo passivo.

Il metodo classico, o almeno quello più vecchio, è l'utilizzo di tabacco attraverso sigarette industriali.

Nel mondo si conta circa che il 22.3% (circa 1.3 miliardi di persone) della popolazione, di età maggiore ai 15 anni, fuma. Questa percentuale include circa il 36.7% degli uomini in tutto il mondo e circa il 7.8% di tutte le donne. L'80% di questi vive in paesi con un reddito medio-basso. In Italia circa il 19% della popolazione fa uso di sigarette industriali, poco più di 10 milioni, più diffuso nelle fasce di età comprese tra i 15 e 44 anni in cui si conta circa 1 fumatore su 4 [dati ISTAT]

Fumo di tabacco classico

Il cavo orale è la l'organo più esposto ai costituenti dei prodotti a base di tabacco o delle sue emissioni. Di conseguenza, la bocca risulta essere sede frequente di neoplasie, e di alterazioni microbiologiche, immunologiche e cliniche date dall'uso di tabacco. Globalmente circa 8 milioni di persone muoiono ogni anno per l'utilizzo di sigarette, e oltre 30 malattie sono associate al fumo quotidiano protratto nel tempo.

Il fumo ingerito direttamente dal fumatore viene definito come "mainstream smoke", questo è un aerosol dinamico che contiene più di quattromila componenti chimici, incluse diverse nitrosammine, la maggior parte di queste si formano nel momento in cui vi è la combustione del tabacco. Molte di queste hanno sono cancerogene e inducono mutazioni cellulari.

I componenti del fumo di sigaretta sono diversamente distribuiti tra la fase particolata e una seconda fase gassosa. Nella fase catramosa (o particolata) ci sono prevalentemente delle particelle semi-liquide il cui diametro, compreso tra 0.1-1 µm, aumenta con la loro coagulazione. Queste componenti includono catrame, fenolo (idrocarburo polinucleare), cresolo, catecolo e tracce di elementi

cancerogeni, nicotina. Quando queste particelle vengono inalate non passano attraverso le pareti alveolari, di conseguenza non daranno dei danni sistemici, ma piuttosto localizzati alla zona della lingua, dei polmoni e della faringe. I componenti della fase gassosa invece comprendono monossido di carbonio, acido cianidrico e ossidi dell'azoto, nitrosammine, idrazine e vinilcloruro, sostanze che hanno attività cancerogena. Questi componenti vivono più a lungo rispetto a quelli della fase catramosa, possono inoltre passare attraverso le pareti dei vasi sanguigni per mezzo della circolazione polmonare, andando a recare danni sistemici che possono manifestarsi in fase acuta o in un tempo successivo. La fase catramosa e la fase gassosa del fumo sono solitamente separate da un filtro, e si possono quindi rispettivamente definire come il materiale intrappolato all'interno del filtro e materiale che passa attraverso.

Tra le componenti di maggiore interesse nelle sigarette vi è la nicotina, questa è un alcaloide che deriva dalle piante di tabacco ed è ciò che crea la dipendenza da fumo. Quando il fumo raggiunge gli alveoli polmonari la nicotina viene assorbita molto rapidamente, circa il 25% di quello che viene inalato raggiunge la circolazione sanguigna e raggiunge il cervello in circa 15 secondi. La dipendenza da nicotina deriva da una diversa combinazione di fattori: vi sono i fattori genetici, ambientali, farmacologici; tuttavia, anche il modo in cui la nicotina viene somministrata ne determina la possibilità che essa diventi una dipendenza, in particolare il fumo delle sigarette è la cosa che crea più facilmente assuefazione.

Ci sono diverse manifestazioni dell'utilizzo di tabacco a livello del cavo orale: macchie estrinseche sul dente, riduzione della sensibilità del fumo e dell'olfatto, melanomi, stomatite nicotinicca, candida, e carie. Il fumo aumenta la possibilità di insorgenza di malattia parodontale, una minore efficacia delle terapie non chirurgiche parodontali, un maggiore rischio di fallimento implantare e una maggiore probabilità di insorgenza di cancro orale e di lesioni precancerose. La correlazione tra fumo di tabacco e carie non è ancora ben definita, molti studi in passato hanno definito il fumo come un fattore di rischio. La carie ha un'eziogenesi multifattoriale, collegata a stile di vita, stato socioeconomico, l'uso di tabacco potrebbe essere un'altra variabile che potrebbe influenzare la comparsa della malattia, senza essere però un diretto agente eziologico.

La magnitudine del rischio di sviluppare malattie correlate al fumo è direttamente proporzionale alla quantità di sigarette consumate, inoltre dipende dalla quantità di catrame e nicotina presente nei prodotti che si vanno ad utilizzare.

Si può affermare per certo che il fumo di tabacco colpisce l'immunità sia innata che acquisita, interrompendo così l'omeostasi immunologica causando diversi tipi di malattie. In particolare, il fumo funziona come una lama a doppio taglio: aumenta la risposta immunitaria patologica e diminuisce le normali linee di difesa.

Il fumo passivo

Il fumo passivo è composto dal sidestream smoke, ovvero il fumo emanato dalla sigaretta accesa, e dal mainstream smoke, ovvero il fumo inalato, filtrato e poi esalato dal fumatore. La maggior parte del fumo passivo è composto dal sidestream smoke, che risulta essere quantitativamente e qualitativamente diverso dal mainstream smoke. Normalmente un non fumatore è esposto a meno tabacco rispetto ad un fumatore; tuttavia, il sidestream smoke è più dannoso in quanto la temperatura di quando viene generato è più alta rispetto alla temperatura del mainstream smoke che viene esalato, inoltre non viene mai filtrato né dal filtro della sigaretta né dai polmoni del fumatore stesso. Il fumo sidestream contiene una maggiore concentrazione di ammoniaca, benzene, nicotina e monossido di carbonio e molti agenti carcinogeni. Molte di queste particelle hanno le dimensioni che permettono loro di infiltrarsi nei polmoni. I non fumatori, soggetti a fumo passivo, hanno circa gli stessi rischi di salute di un fumatore occasionale. Sembra che ci sia una relazione tra dose a cui si è sottoposti ed effetti del fumo passivo. Questo è associato a numerose malattie: problemi di cuore, cancro ai polmoni, ipertensione etc...

Il fumo passivo può avere effetti avversi soprattutto nei bambini in quanto il loro sistema immunitario non è ancora completamente formato. Inoltre, i bambini passano più tempo a casa e di conseguenza hanno più probabilità di essere esposti per lunghi periodi a fumo passivo a causa dei genitori. L'esposizione può portare a: infezioni respiratorie, malattia infiammatoria intestinale, problemi al sonno, bronchite, polmonite, otite media e leucemia. Inoltre, l'esposizione a fumo di sigaretta è collegata a una varietà di problemi comportamentali e intellettuali dei bambini..

Diversi studi sostengono che l'esposizione al fumo passivo nei bambini aumenta la probabilità che questo sviluppi carie, ciò è dovuto a tre fattori. Il primo è l'esposizione dei denti decidui ai componenti tossici del sidestream smoke. La nicotina e metalli pesanti come il cadmio possono andare a danneggiare la mineralizzazione del dente, e inoltre possono recare danno anche alle ghiandole salivari andando così a diminuire il flusso di salivare. Inoltre, il fumo passivo aumenta la colonizzazione della mucosa orale, e crea un deficit nella funzione immunitaria andando a diminuire la vitamina C nel sangue, condizione che è stata associata a sviluppo di carie.

Le sigarette elettroniche

Negli ultimi anni si sono sviluppate nuove tecnologie per il consumo di tabacco, cercando di limitarne gli effetti nocivi. Le sigarette elettroniche sono il primo esempio, entrate nel mercato globale nel 2007, questi sono dei prodotti che deliver un aerosol che contiene nicotina a chi le usa attraverso il riscaldamento di una soluzione solitamente composta da propilene, glicerina e nicotina accompagnate da sostanze che ne danno gusti particolari. In particolare,

Nel 2018 si contavano circa 58.1 milioni di fumatori di sigarette elettroniche nel mondo. In Italia secondo l'ISTAT che dal 2014 raccoglie i dati sull'utilizzo tra la popolazione di 14 anni e più l'uso della sigaretta elettronica riguarda nel 2020 meno del 2,4% della popolazione, (3,0% tra i maschi e 1,9% tra le femmine).

Le sigarette elettroniche sono un prodotto il cui scopo è quel di apportare nicotina al fumatore. Il prodotto è composto da una batteria, un microprocessore, un bottone che attiva la sigaretta, un elemento che riscalda i liquidi presenti nella cartuccia; tutto ciò trasforma la nicotina liquida in vapore, con ciò il fumatore di sigarette elettroniche così che il fumatore abbia una esperienza "smoke-free" durante l'inalazione.

Il liquido è composto da nicotina, agenti che danno un gusto, glicole propilene glicerina vegetale. La concentrazione di nicotina può variare da 0mg/mL a 18 mg/mL, a seconda di quello che sceglie il consumatore. Non ci sono dubbi che i fumatori di sigarette elettroniche sono esposti a meno sostanze tossiche rispetto ai fumatori tradizionali; tuttavia, ci sono ancora problemi di salute derivanti dalle e-cigarettes che sono comunque degni di nota. Circa dal 2009 la consapevolezza dei rischi delle sigarette elettroniche è aumentata esponenzialmente; infatti, si è

sempre dibattuto sulle implicazioni che questo prodotto può dare alla salute generale delle persone, soprattutto perché questo metodo di assunzione di nicotina sta diventando sempre più popolare tra i più giovani e soprattutto tra i non fumatori. Diversi studi dimostrano che coloro che utilizzano di più le e-cigarettes sono giovani in età compresa tra i 18-24 anni, mentre la popolazione più adulta presenta un trend in discesa.

I primi studi riguardanti le componenti delle nubi rilasciate dalle sigarette elettroniche concludevano che queste non davano tanti agenti tossici quanto il fumo tradizionale, tuttavia, studi più recenti associano l'uso di questo prodotto a problemi ai polmoni, malattie cardiovascolari e morte. Gli effetti che si manifestano per primi, poco dopo l'uso, sono tutto sommato moderati e includono irritazione della bocca, mal di testa, tosse secca e nausea; questi effetti collaterali solitamente si risolvono da soli. L'uso prolungato di sigarette elettroniche aumenta il rischio delle malattie che coinvolgono anche il sistema nervoso, immunitario, riproduttivo, il cavo orale.

I liquidi delle sigarette contenenti glicerina, infatti, hanno una viscosità molto alta; gli aerosol generati da queste miscele aderiscono molto facilmente alle superfici esposte all'aerosol. In particolare, aderiscono ai tessuti duri e molli del cavo orale in modo diretto, e a pelle, vestiti e capelli in modo indiretto. L'interazione tra questi liquidi e il cavo orale sono di notevole importanza, in primis perché molte miscele delle sigarette elettroniche assomigliano a caramelle gelatinose, di conseguenza possiamo considerarli un rischio per l'aggregazione di biofilm, e quindi l'aumento di rischio di sviluppare carie.

Sigarette a tabacco riscaldato

Le IQOS sono un prodotto rilasciato sul mercato da Philip Morris International (PMI) nel 2014. Questo prodotto è utilizzato assieme a degli stick contenuti tabacco, che verrà scaldato e non acceso. Sono in aumento le persone che fumano sigarette a tabacco riscaldato: 3,3% del 2022 rispetto al 1,1% del 2019, ma più di una persona su tre (il 36,6%) le considera meno dannose di quelle tradizionali. Questo accade perché le sigarette a tabacco riscaldato sono state messe sul mercato proprio con questo messaggio, sono pubblicizzate come meno dannose sia per il fumatore stesso sia per quelli che potrebbero subire fumo passivo. Dagli

studi emerge che La concentrazione di catrame nel mainstream smoke delle IQOS risulta essere meno della metà di quello di una sigaretta normale, e la concentrazione di CO è pari a un centesimo di quello emessa dalle sigarette normali; quest'ultima cosa, in particolare, è dovuta al diverso meccanismo di azione della sigaretta. A differenza delle sigarette tradizionali le sigarette a tabacco riscaldato presentano un meccanismo unico di riscaldamento, che operano a temperature minori (240°-350°) rispetto alle sigarette industriali (>600°), con l'obiettivo di produrre aerosol di tabacco. Secondo i dati dell'industria del tabacco, assieme ad altri studi indipendenti, l'aerosol generato dalle IQOS è meno dannoso delle sigarette tradizionali per circa il 90-95%. Tuttavia, nonostante sia meno dannoso, il fumo delle IQOS non ha completamente eliminato le sostanze tossiche. Secondo l'organizzazione Mondiale della Sanità, tutte le forme di fumo attivo sono dannose per la salute, compreso il fumo del tabacco riscaldato. La ERS (European Respiratory Society) conclude che, come il fumo di tabacco tradizionale, il fumo delle sigarette a tabacco riscaldato crea dipendenza ed è un rischio per lo sviluppo di neoplasie. Non ci sono dati sufficienti per affermare che il fumare sigarette IQOS, rispetto a fumare sigarette tradizionali, riduca l'esposizione a fumi tossici quanto lo smettere di fumare.

Ci sono studi che si sono concentrati sugli effetti delle IQOS a livello dei polmoni, da questi viene evidenziato che è presente una correlazione tra l'utilizzo di questi prodotti e malattie respiratorie; in particolare vi è un impatto negativo sulla fisiologia polmonare, a livello delle cellule del tessuto epiteliale bronchiale, riniti allergiche e asma. Diverso invece è l'impatto sul sistema cardiocircolatorio, è riferito infatti un minore rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari rispetto ai fumatori tradizionali.

Fumo passivo da tabacco riscaldato

Questo tipo di sigarette sono un prodotto recente e innovativo, da ciò ne consegue il fatto che non vi siano ancora abbastanza studi che possano dire con certezza gli effetti del loro utilizzo. Dopo l'utilizzo della IQOS in ambiente chiuso si è osservata la presenza di particelle proveniente dall'aerosol generato dalla sigaretta; in particolare il livello di nicotina presente nell'ambiente è tale da poter essere assorbito a livello sistemico dai non fumatori. Le conseguenze di questo tipo di esposizione, però, non sono ancora chiare.

Capitolo 2: Analisi statistica

Scopo dello studio

In questo studio abbiamo cercato di capire che tipo di correlazione ci possa essere tra l'esposizione a fumo di tabacco tradizionale e riscaldato e lo sviluppo di carie in pazienti pediatrici.

Materiali e metodi

Questo studio include un campione di 300 pazienti, di età compresa tra i 3 e i 6 anni, i cui genitori o tutori legali hanno deciso di aderire al servizio della clinica dentale, e che hanno dato il consenso di partecipare alla ricerca, tutti sono residenti in Italia.

Ogni genitore/ tutore del paziente ha firmato un consenso informato per la visita ed eventuali trattamenti, e anche la richiesta di poter utilizzare i dati.

La collezione dei dati è avvenuta tra Novembre 2021 e Marzo 2022. Un solo medico ha compiuto la prima visita del paziente. Dopo di ciò, sono stati raccolti dati sull'anamnesi del paziente, includendo domande riguardo alle abitudini alimentari del paziente per durata e tipologia.

Le domande raccolte sono state implementate nell'anamnesi dell'ambulatorio e comprendono:

- Presenza in famiglia a contatto con il paziente di ex fumatori, fumatori di sigarette tradizionali, non fumatori, fumatori di IQOS
- Numero di sigarette fumate al giorno
- Eventuale esposizione del paziente al fumo: esposizione nulla, in casa, in auto, esposizione continua

Sono state inoltre considerate le abitudini alimentari del paziente, tenendo conto del numero di bevande zuccherate, merendine e caramelle ingerite quotidianamente dal paziente.

Per tenere conto del numero di carie presenti o curate si sono utilizzati gli indici dmft per i denti decidui, DMFT per la dentizione permanente, facendo la somma in caso di paziente con dentizione mista. La prima visita del paziente si è svolta nella seguente maniera: il paziente veniva fatto accomodare sulla poltrona del riunito, faceva uno sciacquo di clorexidine 0.2% per circa trenta secondi. Dopo di

ciò il dentista effettuava la visita mediante l'utilizzo di specchietto e specchio, identificando la presenza di denti cariati, mancanti o già trattati. Tutti i dati venivano raccolti nella prima visita.

I dati analizzati sono stati raccolti nell'ambulatorio di odontoiatria pediatrica di Borgo Cavalli, ospedale accademico a Treviso, appartenente l'Università degli Studi di Padova.

Metodi di analisi

L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il programma statistico R. Innanzitutto, è stata eseguita un'analisi per verificare il database, utilizzando un grafico. Sono stati utilizzati i modelli di conteggio di Poisson e Binomiale negativo per i dati. Successivamente è stata effettuata la verifica della significatività delle covarianti, infine sono state tratte le conclusioni dalle analisi fatte.

Modelli di regressione per dati di conteggio

Il classico modello di regressione lineare non è adeguato a spiegare come una variabile discreta, che può assumere solo un piccolo numero di valori con probabilità rigorosamente positive, dipenda da un insieme di altre variabili. Inoltre, è importante calcolare, dopo aver stimato il modello, la probabilità di un evento, date le variabili esplicative, se si verifica. Per questo, è necessario assumere che la variabile endogena segua una specifica distribuzione discreta.

In generale, per la sua semplicità, il modello di regressione di Poisson è il più utilizzato in letteratura per modellare i dati di conteggio. Tuttavia, in alcune situazioni o eventi analizzati, possono presentare troppa dispersione rispetto a quanto ci si aspetterebbe supponendo che rispettino una distribuzione di Poisson che ha la stessa media e varianza. A causa di questo problema, comunemente chiamato sovradisersione, un'alternativa sarebbe quella di considerare il modello del Binomiale Negativo. La sua attrattiva deriva dal fatto che è un modello in grado di spiegare le occorrenze in cui vi sono ragioni per aspettarsi che la relazione valore atteso - varianza assuma una certa forma.

Modello di regressione di Poisson

Il modello di regressione di Poisson svolge un ruolo chiave nell'analisi dei dati di conteggio. Questo tipo di dati assume valori discreti (0, 1, 2, ...), che riflettono il numero di occorrenze di un evento in un periodo fisso. Diversi studi sui dati di conteggio utilizzano la metodologia di regressione di Poisson come modello standard per l'analisi di questo tipo di dati. Tuttavia, questo modello è limitato dal fatto che impone che il valore medio condizionale sia uguale alla varianza condizionale. La conseguenza di ciò è lo scarso adeguamento del modello sottostimando la varianza dei parametri, che si traduce in statistiche di test sovrastimate, distorcendone la significatività.

Siano Y_1, \dots, Y_n variabili indipendenti tali che $Y_i \sim \text{Poisson}(\lambda)$, allora la sua funzione di probabilità è data da:

$$P(Y = y) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^y}{y!}, y = 0, 1, 2, 3, 4, \dots,$$

dove λ_i rappresenta il numero medio di occorrenze del numero di carie osservate nei pazienti. La media e la varianza sono date da:

$$P(Y = y) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^y}{y!}, y = 0, 1, 2, 3, 4, \dots,$$

dove λ_i rappresenta il numero medio di occorrenze del numero di carie osservate nei pazienti. La media e la varianza sono date da:

$$\mathbb{E}(y) = \text{Var}(y) = \lambda.$$

Si consideri la variabile casuale Y che rappresenta il numero di occorrenze di un evento in un dato periodo. Dato $X = (X_1, \dots, X_p)$ un vettore di covariabili e $x_i^t = (x_{i1}, \dots, x_{ip})$ un'osservazione del paziente i , si assume:

$$Y|X = x_i \sim P(\lambda(x_i)),$$

dove $\lambda_i = \lambda(x_i)$ è il numero medio di occorrenze del numero di carie data l'osservazione x_i . Quindi utilizzando una trasformazione come funzione di collegamento del modello lineare generalizzato abbiamo che:

$$\log(\lambda(x_i)) = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip} \quad (1)$$

I coefficienti di regressione β_j , $j=0, \dots, p$ rappresentano la variazione attesa nel logaritmo della media per unità di variazione nella covariata X_j . L'obiettivo è stimare i valori di ogni β_j e per calcolare la stima di ogni parametro di regressione utilizzeremo un metodo iterativo dei minimi quadrati pesati tramite il software statistico R-studio.

Modello di regressione binomiale negativa (BN)

Siano Y_1, \dots, Y_n variabili indipendenti tali che $Y_i \sim \text{BN}(\mu, \alpha)$, allora la sua funzione di probabilità è data da:

$$\begin{aligned} f(y_i|\mu_i, \alpha) &= \frac{\Gamma(y_i + \frac{1}{\alpha})}{\Gamma(y_i + 1)\Gamma(\frac{1}{\alpha})} \left(\frac{1}{1 + \alpha\mu_i}\right)^{\frac{1}{\alpha}} \left(\frac{\alpha\mu_i}{1 + \alpha\mu_i}\right)^{y_i} \\ &= \binom{y_i + \frac{1}{\alpha} - 1}{\frac{1}{\alpha} - 1} \left(\frac{1}{1 + \alpha\mu_i}\right)^{\frac{1}{\alpha}} \left(\frac{\alpha\mu_i}{1 + \alpha\mu_i}\right)^{y_i}, y_i = 0, 1, 2, \dots \end{aligned}$$

dove α è chiamato parametro di omogeneità e essendo $k=1/\alpha$ e $p=1/(1+\alpha\mu)$ otteniamo che la media e la varianza sono date rispettivamente da:

$$\mathbb{E}(y) = \mu \quad e \quad \text{Var}(y) = \mu + \alpha\mu^2$$

Si noti che la varianza della distribuzione binomiale negativa ha un ulteriore termine positivo $\alpha\mu^2$, rispetto alla varianza della distribuzione di Poisson, che, in molti casi, aiuta ad adattare meglio un set di dati in cui c'è una dispersione eccessiva.

Si Consideri la variabile casuale Y che rappresenta il numero di occorrenze di un evento con n osservazioni, allora siano $X=(X_1, \dots, X_p)$ un vettore di covariabili e $x_i^t=(x_{i1}, \dots, x_{ip})$ un'osservazione del paziente i , si assume:

$$Y|X = x_i \sim \text{BN}(\mu(x_i), \alpha),$$

dove $\mu_i=\mu(x_i)$ è il numero medio di occorrenze del numero di carie data l'osservazione x_i . quindi utilizzando una trasformazione come funzione di collegamento del modello lineare generalizzato abbiamo che:

$$\log(\mu(x_i)) = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip} \quad (2)$$

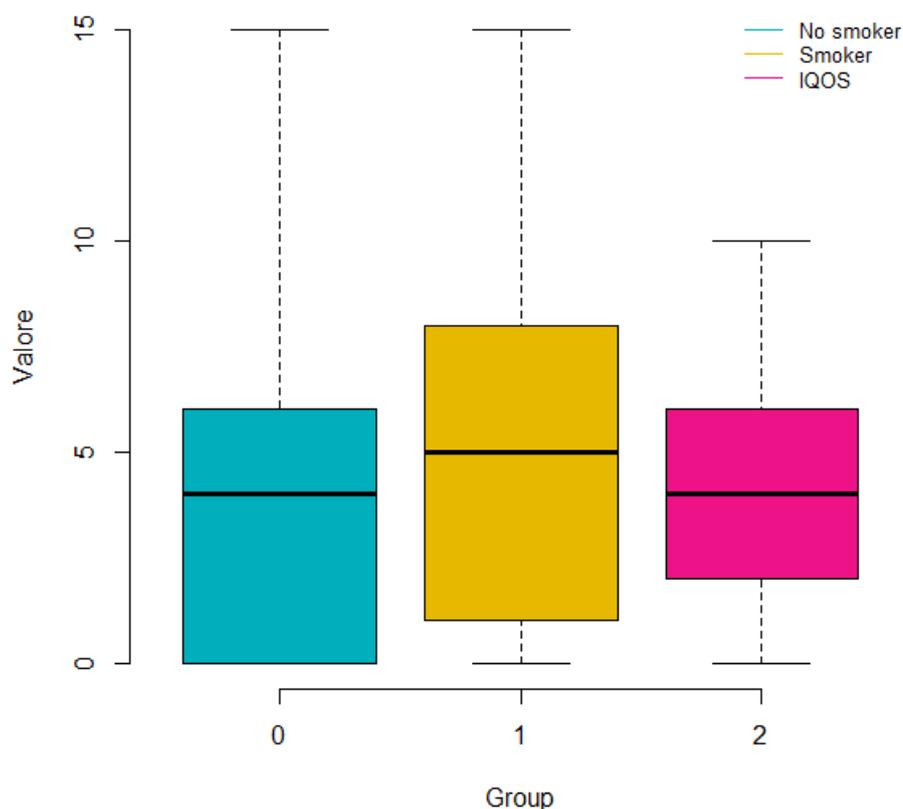
Risultati

Analisi descrittiva

In questa sezione verrà effettuata un'analisi descrittiva dei dati, considerando tutte le variabili osservate nello studio: la quantità di carie che il paziente ha avuto, età del bambino.

Nella Figura 1 è presente il grafico che mi mostra la quantità di carie presente nel bambino, considerando se i genitori sono fumatori o meno. Si può osservare ogni paziente osservato nello studio aveva tra le 0 e 8 carie. Pochissimi bambini avevano più di 10 carie. La maggior parte dei bambini con genitori non fumatori aveva da 0 a 5 carie. Tuttavia, anche in questo gruppo di genitori non fumatori, c'era un record di bambini con più di 10 carie. Quando si osservano i genitori fumatori e il tipo di sigaretta che fumano (fumatore si riferisce al solito e IQOS – elettronico), in generale notiamo un comportamento relativamente simile nella quantità di carie. Le mediane (linea nera all'interno delle caselle) sono vicine, il che mostra un comportamento simile tra i tre gruppi.

Figura 1 – Quantità di carie in relazione all'età



Infine, nella Tabella 1, ci sono le principali misure di posizione e dispersione della variabile di risposta (numero di carie) a seconda che il familiare del paziente sia un fumatore o meno. Si può notare che il valore massimo (Max) osservato è stato di 15 carie sia per i bambini con genitori non fumatori, sia per bambini con genitori fumatori di sigarette tradizionali; mentre per il gruppo che comprende i genitori fumatori di sigaretta tabacco riscaldato (IQOS), il massimo valore di carie osservato nei figli, è pari a 10 carie. Per tutti i gruppi il valore minimo era 0 carie. La media osservata di tutti i gruppi è molto vicina, ma il gruppo con coloro che fumano sigarette tradizionali ottiene una media (4,71) di poco superiore agli altri. La variabilità più alta è stata riscontrata nel gruppo dei fumatori tradizionali mentre la più bassa nel gruppo di fumatori di IQOS.

Tabella 1 – Misure di posizione e dispersione

Group	Min	1st Qu.	Median	Mean	3st Qua	Max	SD
No smoker	0	0	4	3.78	6	15	3.5
Smoker	0	1	5	4.71	8	15	3.7
IQOS	0	2	4	3.89	6	10	2.78

Interferenza

In questa sezione, si eseguono gli aggiustamenti dei modelli statistici citati nella sezione 2.0, ovvero un modello che considera la regressione di Poisson e un altro modello che considera la distribuzione binomiale. Per selezionare quale dei due modelli sarà utilizzato per descrivere l'evento di interesse (numero di carie), si calcola l'Akaike Information Criterion (AIC); questo consiste in una metrica che misura la qualità di un modello statistico, mirando anche alla sua semplicità.

Questa metrica è utile per il confronto e la selezione dei modelli, in cui i valori AIC più bassi rappresenta una maggiore qualità e semplicità dei dati, secondo questo criterio. Per adeguare il modello di conteggio, la variabile di interesse considerata è la quantità di carie presente nei pazienti, mentre le variabili età, frequenza del fumo e tipo di fumatore (non fumatore, tradizionale o IQOS) sono state considerate come variabili esplicative. Pertanto, nella tabella 2, è presente il valore ottenuto dopo aver aggiustato i due modelli citati nella sezione precedente; si può concludere che l'utilizzo del conteggio binomiale negativo è più efficace, perciò è stato scelto questo modello.

Tabella 2- Criterio di selezione del modello

Modello	AIC
Poisson	1764.5
Binomial Negativo	1516.8

Dopo aver scelto il modello di regressione, di seguito si mostrano i valori ottenuti dal modello considerato; poiché l'obiettivo è stimare i valori di β_i dati dall'equazione (2), oltre ai risultati delle stime, si hanno i valori del p-value. Attraverso di esso possiamo concludere che nessuna delle variabili era significativa per spiegare l'evento di interesse, ovvero la quantità di carie, e quindi solo l'intercetta era significativa poiché il p-value era inferiore al livello di significatività del 5%. Inoltre, è si riscontra che il numero medio di carie nei bambini presi in considerazione è di 1,15 carie.

Tabella 3-Stime del modello di regressione binomiale negativo

Name	Estimate	Std. Error	p-value
(Intercept)	1.15	0.285	0.00005
Smoker	0.11	0.195	0.58
IQOS	- 0.04	0.175	0.79
Age	0.03	0.056	0.52
Smoking frequency	0.006	0.00	0.44

Conclusion

Durante tutto il lavoro è stata eseguita un'analisi statistica al fine di verificare l'effetto tra le variabili età, frequenza del fumo e tipo di fumatore (non fumatore, fumatore tradizionale o IQOS) in relazione alla quantità di carie sviluppata nei pazienti. Abbiamo scoperto che nessuno di loro aveva una relazione significativa per spiegare la quantità di carie.

Capitolo 3: Discussione

L'associazione tra fumo e salute del cavo orale è un argomento predominante nella letteratura, come l'associazione tra il fumo passivo da sigarette classiche e presenza di carie nei denti decidui.

L'esposizione dei bambini a fumo passivo potrebbe contribuire a migliorare la capacità di adesione da parte dei patogeni sui tessuti sani dei soggetti non fumatori. I bambini con genitori fumatori sono esposti ai batteri che colonizzano il cavo orale dei genitori, ed è possibile che vi sia una condivisione di teli patogeni attraverso la contaminazione orizzontale, spesso presente in ambiente familiare.

Il nostro ruolo come professionisti è quello di informare i genitori dei possibili rischi dell'esposizione della prole a fumo passivo, come anche informare i fumatori stessi dei rischi che corrono mantenendo l'abitudine. Diversi studi evidenziano la presenza di batteri correlati allo sviluppo di malattia parodontale nel cavo orale di pazienti fumatori, in particolare i pazienti fumatori presentano un numero totale di batteri maggiore rispetto ai pazienti non fumatori. I pazienti fumatori in genere presentano un indice di placca maggiore in confronto a quelli non fumatori; la popolazione batterica sottogengivale di un paziente fumatore sembra aiutare lo sviluppo di batteri che causano parodontite, in particolare *T. forsythia*, *P. micros*, *C. rectus*, and *F. nucleatum*..

In questo studio abbiamo considerato come fumo passivo l'esposizione del bambino ai familiari fumatori in diversi contesti quotidiani. In particolare, si sono considerati 300 pazienti, 100 i cui genitori non erano fumatori, 100 di cui i genitori erano fumatori di sigarette tradizionali, e 100 i cui genitori fumavano IQOS. L'età dei pazienti considerati è compresa tra i 3 e i 6 anni; per avere un dato oggettivo della presenza di denti cariati, ricostruiti o mancanti per carie si sono utilizzati gli indici dmf e DMF, rispettivamente per denti decidui e denti permanenti. I risultati del nostro studio evidenziano come la presenza di carie non sembra dipendere dal tabagismo dei genitori; il numero di carie presenti nel gruppo di controllo, ovvero i bambini con genitori non fumatori, è associato anche ai bambini con genitori fumatori di sigarette tradizionali o fumatori di IQOS.

Confronto con la letteratura internazionale

Fumo passivo dato da tabacco classico

Keiko Tanaka et al (2006) hanno compiuto uno studio sulla popolazione infantile giapponese a livello nazionale. In particolare, i dati dello studio sono stati raccolti grazie al NNS (National Nutrition Survey) e dal NSDD (National survey of dental diseases), sono stati tenuti in considerazione tutti i pazienti che si sono sottoposti ad entrambi i questionari, con età compresa tra gli 1 e i 14 anni. Un medico specializzato ha visitato tutte le famiglie dei soggetti aderenti allo studio, sono stati raccolti dati sulle abitudini della famiglia da quelle alimentari alle abitudini viziate come il fumo (per i soggetti oltre i 20 anni), inoltre i partecipanti si sono sottoposti ad una visita dentistica da cui sono stati ricavati il dmf e il DMF. Oltre a questo, i partecipanti sono stati sottoposti ad un colloquio per discutere le loro abitudini di igiene orale domiciliare. In tutto sono stati considerati 925 individui.

Dallo studio emerge che circa il 43% dei soggetti considerati presentava almeno un fumatore in casa; tuttavia, i dati non evidenziano una correlazione tra fumo passivo e presenza di carie nei pazienti pediatrici. Gli autori dello studio non hanno una spiegazione immediata per le loro osservazioni. Il fumo attivo e passivo andrebbe ad intaccare la salute del cavo orale con meccanismi simili; tuttavia, la differenza sta nella dose di fumo ingerita, in quanto è significativamente minore se inalato in modo passivo.

Nonostante la quantità di fumo sia quantitativamente minore nei soggetti esposti a fumo passivo, i residui di nicotina sono presenti. A. Avsar et al. Hanno analizzato gli effetti dell'esposizione a nicotina andando a misurare i livelli di un suo metabolita, la cotinina, presente nella saliva dei soggetti esposti. Controllare la presenza di cotinina nella saliva, nel sangue o nelle urine può essere un metodo efficace per controllare l'associazione dose-dipendente tra l'esposizione a fumo passivo, a breve termine, e la presenza di carie. Sono stati presi in considerazione 90 soggetti in età compresa tra i 4 e i 6 anni. I bambini sono stati intervistati sull'ambiente familiare, abitudini di spazzolamento dieta etc... Tutti i soggetti erano già sottoposti a fluorizzazione sistemica in quanto residenti a Samsun, città in cui l'acqua contiene 0.3 ppm di fluoro. La presenza di carie è stata rilevata da

due dentisti appartenenti alla clinica di pedodonzia dell'università di Ondokuz. I risultati evidenziano che il dmf nei pazienti esposti a fumo passivo è significativamente maggiore rispetto ai valori del gruppo di controllo; è stata inoltre evidenziata una associazione positiva tra il livello di cotinina presente nella saliva e il dmf. In questo studio il livello del pH, l'efficienza dell'effetto tampone e la quantità di saliva erano tutte minori nei pazienti esposti a fumo passivo rispetto al gruppo di controllo. Secondo Aligne et al. Il fumo passivo potrebbe ridurre le proprietà protettive della saliva. Diversi studi in passato hanno evidenziato la correlazione tra fumo passivo e l'infiammazione del tratto respiratorio, che si manifesta attraverso diversi sintomi, tra cui la rinite allergica, che spesso costringe il malato ad una respirazione buccale, che a sua volta risulta nella secchezza del cavo orale. L'associazione tra la poca salivazione e carie è stata confermata dalla letteratura odontoiatrica.

Anche Goto et al. Hanno misurato i livelli di cotinina nei soggetti esposti a fumo passivo. Il loro studio ha avuto come punto cardine, oltre l'indice dfm per quantificare la presenza di carie, anche una osservazione dei livelli di cotinina presente nelle urine dei bambini presenti nello studio. I soggetti considerati hanno un'età compresa tra i 3 e i 6 anni che sono iscritti a due diversi asili nidi facenti parte o del college femminile di Aichi Bunkyo o della prefettura di Aichi, in Giappone. I dati sono stati raccolti tra ottobre e novembre del 2006. In soggetti, che si sono anche sottoposti agli esami delle urine, sono 399. La prima parte dello studio consisteva nella somministrazione di uno questionario con domande indicative al fumo in famiglia, alla frequenza etc...., la seconda parte consisteva nell'analisi di laboratorio delle urine dei soggetti sottoposti allo studio.

Dallo studio emerge che l'esposizione al fumo passivo, in particolare quello dato dalle madri, possa avere una correlazione con la presenza di carie; in Giappone, infatti, molti bambini in età prescolare passano la maggior parte del loro tempo con le madri, perciò essi risultano più suscettibili. Questo studio, inoltre, sottolinea la relazione tra tempo di esposizione al fumo passivo e lo sviluppo di carie. L'associazione tra carie e fumo passivo dato dai padri o da altri familiari risulta essere più debole, e la relazione con i tempi di esposizione non è significativa in questi casi. Dallo studio emerge anche una correlazione tra il livello di cotinina presente nelle urine e la presenza di carie, in particolare, si è

trovato che una maggiore esposizione, quindi maggiori livelli di cotinina, corrispondevano ad una aumentata presenza di carie.

Pita-Fernández S. et al. Hanno compiuto uno studio su un campione di 281 bambini in età compresa tra i 5 e 14 anni. I bambini sono stati visitati da due dentisti seguendo le indicazioni dell'OMS. Sono stati somministrati questionari che si concentravano sulla frequenza di spazzolamento, assunzione di zuccheri e la presenza di tabagisti in famiglia. Dall'analisi dei dati emerge che la prevalenza di carie aumenta progressivamente con l'aumento dell'abitudine di fumare dei genitori. La prevalenza di carie nei bambini con genitori non fumatori è pari al 12.4%, mentre nei bambini con entrambi i genitori fumatori è pari al 28.3%, nella dentizione permanente. Lo stesso fenomeno si può osservare nella dentizione decidua, in quanto la prevalenza di carie aumenta dal 21.6 al 34.8%. Lo studio, dopo aver analizzato i diversi bias, come frequenza di spazzolamento, frequenza di ingestione di zuccheri, afferma che non vi è una rilevanza statistica dei risultati trovati; tuttavia, è suggerita una correlazione tra dose di esposizione e rischio di sviluppare la patologia cariosa.

Alcuni studi hanno preso in considerazione anche come il peso del bambino in età infantile e lo sviluppo di malattie in periodo neonatale possano influenzare la presenza di carie. Un esempio è lo studio di J.D. Shulman. I dati analizzati sono stati raccolti nel terzo NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey). Questo ha come diversi obiettivi: avere un'idea della prevalenza di certe malattie e dei fattori di rischio ad esse correlate, contribuire allo studio dei fattori eziologici di certe malattie. Questo studio è stato somministrato a tutta la popolazione non istituzionalizzata in età superiore a due mesi, in tutti i 50 stati americani. La raccolta dei dati è avvenuta tra il 1988 e il 1994, e in totale il sample comprendeva 39.695 individui, di cui 8.836 bambini in età compresa tra i due mesi e i sei anni, nati tra il 1982 e 1994. Nello studio sono stati somministrati questionari alle diverse famiglie ed è stata effettuata una visita odontoiatrica della durata di circa 8 minuti, in cui si è valutata la salute del cavo orale del bambino e la presenza di carie. Sono stati presi dati anche sulle abitudini salutari delle famiglie, in particolare l'uso di sigarette da parte della madre nel periodo post-natale. I soggetti presi in considerazione per l'analisi statistica sono in totale

4.207; la loro tesi associava, oltre al fumo, il peso del nascituro alla possibilità di sviluppare carie, rischio dato sia da fattori pre-natali che post-natali. Lo studio conclude che la un bambino sottopeso non è indice di maggior rischio di sviluppare carie, né altri fattori problematici durante la gravidanza, come il fumo, ne sono indicatori, sono solo fattori di rischio.

Lo studio di Mahmood SDhahir Al-Mendalawi et al. ha preso in considerazione lo stesso soggetto, concentrandosi anche sullo stato socioeconomico delle famiglie sulla loro frequenza e sul modo di spazzolamento. Lo studio comprendeva 684 pazienti sotto i 6 anni, in cura all'ospedale pediatrico universitario Al-Aulwyiah a Baghdad. I pazienti sono stati sottoposti ad una visita odontoiatrica, sono quindi stati raccolti gli indici DMF e dmf, presenza di genitori fumatori e altri fattori. Nemmeno in questo studio è stata rilevata una correlazione tra fumo da parte dei genitori e presenza di carie; tuttavia, un'incidenza maggiore di carie si è riscontrata in soggetti con uno stato socioeconomico basso, con la presenza di genitori meno educati accademicamente. Genitori con un livello di studio alto hanno una maggiore comprensione dell'importanza delle manovre di igiene orale allo scopo di prevenire carie; da ciò consegue una loro maggiore attenzione verso la salute orale dei loro figli. Le abitudini di igiene orale e di alimentazione sono solitamente date nei primi anni di infanzia, e i genitori sono fondamentali per dare il buon esempio.

Nello studio è evidenziata una maggiore correlazione tra metodo di spazzolamento e presenza di carie. È stato dimostrato che i genitori con una maggiore conoscenza dei rischi della salute del cavo orale contribuiscono ad un pattern di mantenimento dell'igiene migliore rispetto ai genitori meno informati. Ciò dimostra quanto l'istruzione dei genitori sia fondamentale per la prevenzione della carie, così come l'istruzione ai bambini stessi, che dovrebbe essere promossa anche dalle scuole e non solo da figure come il pediatra, favorendo un approccio diretto (10). Una metanalisi condotta da F. Schwendicke conferma che un livello socioeconomico basso è associato ad una maggiore presenza di carie. L'educazione dei genitori può determinare il reddito familiare, quindi controlla l'accesso a misure preventive domiciliari come il dentifricio fluorato, oppure la possibilità di avere una dieta a base di prodotti poco calorici e poco zuccherati; viene limitato anche l'intervento professionale, in quanto potrebbe non esserci la

possibilità economica di fare le sigillature dei solchi privatamente. L'istruzione della popolazione ha un effetto diretto sull'influenzare uno stile di vita sano e un mantenimento della salute del cavo orale. Il coinvolgimento sociale della persona, inoltre, influenza in modo positivo il giusto mantenimento e la cura della propria salute, compresa quella del cavo orale.

Su questo si concentra anche lo studio di Nayani et al. Che Hanno studiato una correlazione tra fumo passivo e carie nella città di Karachi, in Pakistan. In particolare, questo è uno studio cross-sectional che riguardava 500 bambini tra i 5 e 14 anni residenti nella zona urbana o extraurbana di Karachi. I soggetti si sono sottoposti ad una visita dentistica, effettuata con una torcia a mano ed uno stick di legno per tenere la lingua dei pazienti. Per lo studio sono stati considerati come cariati i denti con chiare lesioni dello smalto, denti con filling temporaneo, denti che erano sigillati ma comunque cariati, sono stati considerati come cariati di conseguenza. L'esposizione a fumo passivo è stata considerata nel caso di fumo da parte dei familiari vicino al bambino durante i pasti, mentre il bambino giocava, mentre guardava la TV, mentre il bambino dormiva, per essere considerata esposizione passiva l'esposizione doveva essere di almeno 6 mesi. Dall'analisi dei dati emerge che la prevalenza di carie nei bambini con familiari fumatori è rispettivamente del 76.3% e 75.9% rispettivamente nelle zone extra urbane e urbane della città; i soggetti esposti a fumo passivo hanno circa 1.3 volte la quantità di carie rispetto a quelli non esposti. I risultati evidenziano che i bambini che vivono nell'area extra urbana, in famiglie di stato socioeconomico basso, hanno una maggiore esposizione a fumo passivo e una prevalenza maggiore di carie. Una spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere che l'esposizione al fumo possa aver intaccato l'efficacia del sistema immunitario, predisponendo i bambini ad varie infezioni. Diversi studi in letteratura sostengono che la nicotina diminuisce l'attività fagocitaria dei monociti e dei neutrofili.

Shiro Tanaka et al. Nel 2015 hanno condotto uno studio sulla popolazione giapponese. Questo è uno studio coorte che ha preso come dati quelli raccolti durante i check-up nella città di Kobe in Giappone tra il 31 marzo del 2004 e il 1° aprile 2014. Queste visite sono obbligatorie e sono protette dal Maternal and Child Health Act, tutelando le donne potenzialmente fertili e i bambini fino ai 3

anni. Kobe è la sesta città più grande del Giappone, comprendendo una popolazione di 1.5 milioni di persone, il campione di questo studio comprende 76.920 bambini. Nello studio presentato, sono stati considerati i bambini nati tra il 2004 e il 2010, che presentavano informazioni sulla possibile esposizione a fumo passivo nei diversi check up (il primo a 4 mesi, il secondo a 18 mesi, l'ultimo a 3 anni). Durante le visite sono stati raccolti dati riguardante le abitudini dei genitori attraverso questionari, indicando la presenza di fumatori durante il periodo di gestazione, dalla madre stessa a parenti esterni, familiari fumatori dopo la gestazione, quantità di sigarette fumate, se vi erano fumatori nella vita del bambino a 4,9,18 mesi e infine all'ultima visita dei tre anni. Le visite su paziente sono state eseguite da dentisti nelle visite dei 18 mesi e nella visita dei 3 anni del bambino. L'incidenza delle carie è stata data dall'indice dmf. I risultati evidenziano che il rischio di sviluppare carie, nei bambini esposti a fumo passivo, è circa il doppio rispetto ai bambini non esposti. Dallo studio emerge che le abitudini dei bambini esposti e non esposti a fumo passivo sono significativamente diversi: i bambini esposti a fumo passivo spesso avevano una frequenza di spazzolamento irregolare, e un consumo di dolci maggiore rispetto ai bambini del gruppo di controllo. I risultati dello studio potrebbero non essere preoccupanti, tuttavia è da tenere in conto che circa il 40% dei bambini nel mondo è esposto a fumo passivo; l'educazione sugli effetti negativi del fumo nei bambini a livello del cavo orale potrebbe aumentare la consapevolezza dei genitori della salute del proprio figlio.

Fumo passivo da IQOS e da sigarette elettroniche

Non sono ancora presenti studi che abbiano come soggetto la correlazione tra carie e fumo passivo dato dai dispositivi IQOS. Si può però affermare che è presente una differenza tra la qualità dell'aria prima e dopo l'utilizzo di un dispositivo IQOS in ambiente chiuso. Schober et al hanno dimostrato tale corrispondenza. Questo studio ha utilizzato uno spettrometro laser, che capta l'aerosol, posizionato in macchine di diversa grandezza e ventilazione, con l'intento di misurare la concentrazione delle particelle fine ed ultrafine rilasciate dal fumatore. Il sensore veniva posizionato nei sedili posteriori, corrispondente circa alla zona in cui respira un passeggero. Per lo studio sono stati registrate le

concentrazioni delle particelle rilasciate da sigarette tradizionali, sigarette elettroniche e sigarette a tabacco riscaldato.

I risultati evidenziano che in ambiente chiuso che la concentrazione di propilene glicolato, un composto potenzialmente irritante per occhi e tratto respiratorio, aumenta dopo l'utilizzo delle sigarette elettroniche; queste particelle possono penetrare e depositarsi nei polmoni, dando stress ossidativo e reazioni infiammatorie. Le e-cigarettes, inoltre, rilasciano nicotina nell'ambiente, la saturazione osservata raggiungeva una concentrazione pari a 4–10 µg/m³. Sono stati osservati gli stessi risultati dopo l'utilizzo delle IQOS. Si può affermare che l'esposizione protratta a nicotina, data dal fumo passivo, è associata ad un rischio di assorbimento a livello sistemico da parte dei non fumatori.

Il vaping delle sigarette elettroniche rilascia particelle più grandi rispetto a quelle rilasciate dalle IQOS. Dallo studio si possono trarre le conclusioni che il fumo di sigarette elettroniche e di IQOS hanno effetti avversi in ambienti chiuso poiché rilasciano particelle fine ed ultrafine possibilmente dannosi per chi ci è esposto. Tuttavia, gli effetti a lungo termine di tali esposizioni non sono ancora chiari.

Capitolo 4: conclusioni

In letteratura sono evidenziati risultati differenti; una maggioranza di studi supporta la correlazione tra fumo passivo e carie nei bambini, mentre vi sono comunque degli studi in cui questa correlazione non è comprovata.

In questo studio il focus principale è stato quello di individuare una correlazione tra la presenza di carie nei pazienti pediatrici e la presenza di familiari fumatori. I risultati dell'analisi statistica non evidenzia nessuna differenza nel dmf tra i pazienti del gruppo con familiari non fumatori, rispetto ai gruppi con familiari fumatori di IQOS oppure fumatori di sigarette tradizionali.

La letteratura riguardante l'esposizione a fumo passivo da IQOS è ancora limitata, e per adesso non vi siano studi che hanno cercato una correlazione tra fumo passivo e carie nei denti decidui.

Nonostante il nostro studio non evidenzi nessuna correlazione, è fondamentale che venga incrementata la consapevolezza dei genitori riguardante la salute del cavo orale dei propri figli, attraverso istruzione del mantenimento dell'igiene a livello pediatrico e incentivando visite dal dentista e dall'igienista fin dall'età infantile.

BIBLIOGRAFIA

1. *RIsk factors associated with deciduous tooth decay in Iraqi preschool children* . **Mahmood Dhahir Al-Mendalawi, Nadia Taha Karam.** 2014, Avicenna Journal of medicine , Vol. 4.
2. **Anastasi , Giuseppe, et al.** *Anatomia Umana* . s.l. : edi-ermes, 2010.
3. *Understanding dental caries as a non-communicable disease.* **Nigel Pitts, Svante Twetman, Julian Fisher, Phili D. Marsh.** 12, 2021, British Dental Journal, Vol. 231, p. 749-753.
4. **Adamo, S., et al.** *Istologia di Monesi.* Padova : Piccin , 2018.
5. **Fonzi, Luciano.** *Anatomia funzionale e clinica dello splancnocranio.* s.l. : Edi-Ermes, 2000.
6. *The Oral Microbiome in Dental Caries.* **I. Strużycka, Zakład Stomatologii Zintegrowanej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Miodowa.** 2, Warsaw : s.n., 2014, Polish Journal of Microbiology, Vol. 63, p. 127-135.
7. *Global Burden of Oral Conditions.* **W. Marcenes, N.J. Kassebaum, E. Bernabé, A. Flaxman, , M. Naghavi, A. Lopez, C.J.L. Murray.** 7, s.l. : International & American Associations for Dental Research, 2013, J Dent Res, Vol. 92, p. 592-597.
8. *Dental plaque as a Microbial Biofilm.* **P.D., Marsh.** 2004.
9. *Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing.* **Cephas KD, Kim J, Mathai RA, Barry KA, Dowd SE, Meline BS, Swanson KS.** 2011, PLoS One.
10. *Mutans streptococci acquisition and transmission.* **R.J., Berkowitz.** 2006, Pediatric Dentistry 2, p. 106-109.
11. *Saliva bacterium interactions in oral microbial ecology.* **F.A., Scannapieco.** 5, 1994, Crit, Rev, Oral Biol. Med., p. 203-204.
12. *Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases.* **R.J., Gibbons.** 68, J. Det. Res. : s.n., 1989, p. 750-760.
13. *On the formation of dental plaques.* **Gibbons, R. J., and J. van Houte.** 1973, J. Periodontol , Vol. 44, p. 347-360.
14. *Identificazition of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates* . **Pearce C, Bowden G H, Evans M, Fitzsimmons S P, Johnson J, Sheridan M J, Wientzen R, Cole M F.** 1995, J Med Microbiol , p. 67-72.
15. *Enzymes in the acquired enamel pellicle.* **Hannig C., M. Hannig and T. Attin.** 2005, Eur. J. Oral Sci., Vol. 113, p. 2-13.
16. *Maintaining the integrity of the enamel surface. The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel*

demineralization and remineralization. **Hics., Garcia-Godoy F. and J.** 2008, JADA, Vol. 139, p. 25-34.

17. *Global diversity in the human salivary microbiome.* **Nasidze L., J. Li, D. Quinque, K. Tang and M. Stoneking.** 2009, Genome Res, Vol. 19, p. 636-643.

18. *Dental plaque biological significance of a biofilm and community life style.* **P.D., Marsh.** 2005, Clin. Periodontol, Vol. 32, p. 7-15.

19. *Effect on caries of restricting sugars intake: systematic review to.* **Moynihan, P.J. & Kelly, S.A.** 2014, J. Dent. Res, Vol. 93, p. 8-18.

20. *Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized.* **Sheiham, A. & James, W.P.** 10, 2015, J. Dent. Res, Vol. 94, p. 1341-1347.

21. *Defining the Norma Bacterial Flora of the oral cavity.* **Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I e Dewhirst FE.** 11, 2005, J. Clin. Microbiol. , Vol. 43.

22. *Microbial population shifts in developing human dental plaque.* **HL., Ritz.** 1967, Arch. Oral Biol. , Vol. 12, p. 1561-1568.

23. *Bacterial succession in dental plaque: role in dental disease.* **W.J., Loesche.** 1975, Microbiology , p. 132-136.

24. *Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage .* **Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermudez E.** 1998, Chem Res Toxicol, Vol. 11, p. 441-448.

25. *Estimation of the global number of e-cigarette users in 2020.* **Tomasz Jerzyński, Jerzyński, T., Stimson, G. V., Shapiro, H., & Król, G.** 1, 2020, Harm reduction journal, Vol. 18, p. 109.

26. *Cigarette smoking and oral health among healthcare students .* **P. KOMU, E. A. O. DIMBA, F. G. MACIGO,A. E. O. OGWELL.** 4, 2009, East african medical journal , Vol. 86, p. 178-182.

27. *Dental patient awareness of smoking effects on oral health: comparison of smokers and non-smokers.* **Khalaf F. Al-Shammari, Mohamed A. Moussa, Jassem M. Al-Ansari, Yousif S. Al-Duwairy, Eino J. Honkala.** 2006, Journal of dentistry , Vol. 34, p. 173-178.

28. **Physicians, Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians.** Harm reduction in nicotine addiction: helping people who can't quit .
<http://www.rcplondon.ac.uk/sites/default/files/documents/harm-reduction-nicotine-addiction.pdf>. [Online] 2007.

29. *Nicotine addiction.* **NL, Benowitz.** 1999, Prim Care , Vol. 26, p. 611-631.

-
30. *Nicotine for schizophrenia*. **Punnoose S, Belgamwar MR**. 2006, Cochrane Database Syst Rev .
 31. *Tobacco and Tobacco Smoke*. **Hecht, S. S., & Hoffmann, D.** 6, 1998, Vol. 9, p. 875-884.
 32. *Health hazards of passive smoking*. **Michael P. Eriksen, Chartes A. LeMaistre, and Guy R. Newell**. 1988, Annu. Rev. Public Health, Vol. 9, p. 47-70.
 33. *Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down?* . **Feifei Qiu, Chun-Ling Liang, Huazhen Liu, Yu-Qun Zeng, Shaozhen Hou, Song Huang, Xiaoping Lai, Zhenhua Dai**. 1, 2017, Oncotarget, Vol. 8, p. 268-284.
 34. *Toxicity of electronic cigarettes: A general review of the origins, health hazards, and toxicity mechanisms*. **Cao Y, Wu D, Ma Y, Ma X, Wang S, Li F, Li M, Zhang T**. 10 Jun 2021, Sci Total Environ.
 35. *Cariogenic potential of sweeter flavors in electronic-cigarette liquids* . **Kim SA, Smith S, Beauchamp C, Song Y, Chiang M, Giuseppetti A., et al.** 9, PLoS ONE , Vol. 13.
 36. **Ibrahim, Eman M Al-Sayed and Khadiga Salah**. Second-hand tobacco smoke and children. 2014.
 37. *Ecological significance of coaggregation among oral bacteria*. **Kolenbrander P.E., London J**. New York : s.n., 1996, Advances in microbiology ecology, Vol. 12, p. 183-218.
 38. *A quantitative method to study coadhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber: basic principal of the analysis*. **Bos R, Van der Mei HC, Meinders JM, Busscher HJ**. 1994, Microbiol Meth , Vol. 20, p. 289-305.
 39. *On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion*. **Busscher HJ, Cowan MM, Van der Mei HC**. 1992, Microbiol Rev , Vol. 88, p. 199-210.
 40. *Microbiologia odontoiatrica* . **Marsh P., Martin M.V**. 2005.
 41. *Genetic competence and transformation in oral Streptococci*. **DG, Cvitkovitch**. 2001, Crit Rev Oral Biol Med , Vol. 12, p. 217-243.
 42. *Lateral genomics*. **WF, Doolittle**. Trends Cell Biol , Vol. 9.
 43. *The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm*. **Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP**. 1998, Science, Vol. 280, p. 295-298.
 44. *Genetic analyses of bacterial biofilm formation*. **Pratt LA, Kolter R**. 1999, Curr Opin Microbiol , Vol. 2, p. 298-603.
 45. *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm* . **Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG**. 2002, J. Bacteriol , Vol. 184, p. 1140-1154.

-
46. *Biofilm as complex differentiated communities*. **Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW**. 2002, *Annu Rev Microbiol* , Vol. 56, p. 187-209.
47. *The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases?* **Scheie A A, Petersen F C**. 1, 2004, *Crit Rev Oral Biol Med* , Vol. 15, p. 4-12.
48. *Cell-cell communication in grampositive bacteria* . **Dunny GM, Leonard BA**. 1997, *Annu Rev Microbiol* , Vol. 51, p. 582-587.
49. *How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing*. **BL, Bassler**. 1999, *Curr Opin Microbiol* , Vol. 2, p. 582-587.
50. *Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships* . **Kievit TR, Iglewski BH**. 2000, *Infect Immun* , Vol. 68, p. 4839-4849.
51. *Quorum sensing in bacteria* . **Miller MB, Bassler BL**. 2001, *Annu Rev Microbiol* , Vol. 55, p. 165-199.
52. *Introduction to biofilm* . **JW, Costerton**. 1999, *Int J Antimicrob Agents* , Vol. 11, p. 217-221.
53. *Comparison between CLSM and SEM for the study of plaque*. **Moss M.C., Jones C.L., Cummins D., Cummins P.G., Howard C.V**. 1991, *J. Dent Res* , Vol. 70.
54. *Exposición pasiva al tabaco y caries dental de los niños*. **Pita-Fernández S, et al**. 2011, *Arch Bronconeumol*, Vol. 47, p. 419-420.
55. *Association of smoking in Household and dental caries in Japan* . **Keiko Tanaka, Takashi Hanioka, Yoshihiro Miyake, Miki Ojima, Hitoshi Aoyama**. 4, 2006, *Journal of Public Health Dentistry* , Vol. 66, p. 279-281.
56. *Is there an association between low birth weight and caries in the primary dentition?* . **Shulman, J.D**. 2005, *Caries Research* , Vol. 39, p. 161-167.
57. *An Overview of the oral health component of the 1988-1991 national health and nutrition examination survey* . **T.F. Drury, D.M. Winn, C.B. Snowden, A. Kingman, D.V. Kleinman, B. Lewis**. 1996, *J Dent Res* , Vol. 75 (Spec Iss), p. 620-630.
58. *Secondhand smoke and incidence of dental caries in deciduous teeth among children in Japan: population based retrospective cohort study*. **Shiro Tanaka, Maki Shinzawa, Hironobu Tokumasu, Kahori Seto, Sachiko Tanaka, Koji Kawakami**. 2015, *TheBMJ*, Vol. 351, p. 1-8.
59. *Exposure to heated tobacco products and adverse health effects, a systematic review* . **Malgorzata Znyk, Joanna Jurewicz, Dorota Kaleta**. 2021 , *Int. J. Environ. Res. Public Health*.
60. *Passive exposure to pollutants from conventional cigarettes and new electronic smoking devices (IQOS, e-cigarettes) in passenger cars*. **Wolfgang Schober, Ludwig Fembacher, Adela Frenzen**,

Hermann Fromme. 2019, International Journal of Hygiene and environmental health .

61. *The impact of smoking on oral and nasopharyngeal bacteria flora .* **Brook, I.** 6, 2011, J dent res , Vol. 90, p. 704-710.

62. *Socioeconomic Inequality and Caries: a systemic review and meta-analysis.* **F. Schwendicke, C.E. Dörfer, P. Schlattmann, L. Foster Page, W.M. Thomson, S. Paris.** 2014, Journal of dental research , p. 1-9.
