



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Cliniche
Curriculum Patologia e Clinica dell'Apparato Locomotore e
dei Tessuti Calcificati

CICLO XXXIV

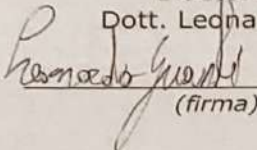
COORDINATORE Prof. Lorenzo Cosmi

*La relazione tra osteoporosi e parodontite: studio sull'effetto della dieta e del
microbiota orale sul metabolismo osseo*

Settore Scientifico Disciplinare MED-13

Dottorando

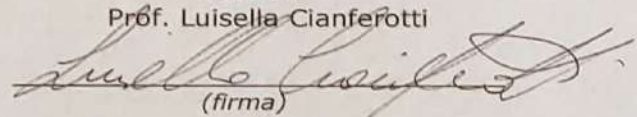
Dott. Leonardo Guasti



(firma)

Tutore

Prof. Luisella Cianferotti

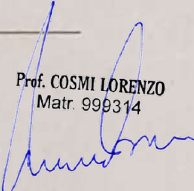


(firma)

Coordinatore

Prof. Lorenzo Cosmi

(firma)


Prof. COSMI LORENZO
Matr. 999314

Anni 2018/2020

Sommario

Introduzione	3
L'Osteoporosi.....	3
Epidemiologia dell'osteoporosi.....	4
Eziopatogenesi delle fratture osteoporotiche.....	5
Fisiopatologia	5
Classificazione.....	6
Fattori di rischio	7
Sintomatologia.....	7
La malattia parodontale	7
Epidemiologia della malattia parodontale	7
Eziopatogenesi della malattia parodontale	8
Il microbiota orale	9
Microbiologia parodontale	11
Il ruolo della nutrizione nella malattia parodontale.....	14
Obiettivi dello studio.....	16
Endpoint	17
Materiali e Metodi.....	17
Disegno dello studio.....	17
Popolazione in studio	17
Criteri d'inclusione.....	17
Criteri d'esclusione.....	17
Reclutamento e raccolta dei dati	18
Piano statistico.....	27
Risultati	27
Statistiche descrittive della popolazione in studio.....	27
Età media ed antropometria.....	28
Questionario anamnestico	29
Questionario alimentare	32
Marker turnover osseo e mineralometria ossea.....	35

Grading della malattia parodontale	36
Analisi microbiologiche	37
Analisi genetiche	40
Statistiche inferenziali - Significatività	44
Studio delle differenze nei consumi alimentari e nell'assunzione di nutrienti tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici e osteoporotici	44
Valutazione delle differenze nel microbiota orale tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici ed osteoporotici	48
Ulteriori analisi di significatività.....	53
Statistiche inferenziali – Correlazioni	53
Valutazione delle correlazioni tra profondità di tasca (PPD) e t-score	53
Valutazione della correlazione tra recessione gengivale (REC) e t-score.....	53
Valutazione delle correlazioni tra indice di placca e t-score	54
Valutazione delle correlazioni tra l'indice di placca e l'assunzione di nutrienti (Calcio, Carboidrati e vitamina C)	55
Valutazione delle correlazioni tra l'introito di nutrienti e le concentrazioni microbiche	56
Valutazione della correlazione tra concentrazioni di MMP-8, profondità di tasca e recessione gengivale	60
Valutazione della correlazione tra concentrazioni di MMP-8 e concentrazioni microbiche.....	61
Valutazione della correlazione tra il polimorfismo TaqI del gene VDR rispetto al grading della malattia parodontale	63
Ulteriori analisi di correlazione	63
Discussione.....	63
Valutazioni descrittive.....	63
Valutazioni in ambito nutrizionale	64
Valutazioni in ambito parodontale e osseo.....	65
Valutazioni in ambito microbiologico.....	65
Valutazioni in ambito genetico.....	66
Conclusioni.....	66
Bibliografia.....	67

Introduzione

L'Osteoporosi

L'osteoporosi è una malattia sistemica dello scheletro, caratterizzata da una riduzione della massa ossea e da alterazioni qualitative delle proprietà materiali della macro e microarchitettura ossea, che si accompagnano ad un aumento del rischio di frattura (Adami et al. 2009) anche a causa di traumatismi minimi. Si parla di "osteoporosi primaria" quando la riduzione della densità minerale ossea (Bone Mineral Density BMD) e le fratture si manifestano nelle donne dopo la menopausa (osteoporosi postmenopausale) o comunque con l'avanzare dell'età in entrambi i sessi (osteoporosi senile). Il termine osteoporosi secondaria invece si riferisce alla perdita ossea causata da patologie cliniche specifiche, come la tireotossicosi o l'ipersurrenalismo (Gardner & Shoback 2009).

L'indagine densitometrica consente oggi di misurare in modo accurato e preciso la massa ossea ed in particolare la BMD in g/cm^2 di superficie ossea. La BMD è responsabile della resistenza meccanica dell'osso per il 60-80%.

Per l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), la diagnosi densitometrica di osteoporosi si basa sulla valutazione con tecnica dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) della densità minerale, in comparazione a quella media di soggetti adulti e sani e l'unità di misura è rappresentata dalla deviazione standard dal picco medio di massa ossea (T-score). Questa rappresenta il test diagnostico di osteoporosi e di rischio di frattura (Adami et al. 2009). È stato osservato che il rischio di frattura inizia ad aumentare in maniera esponenziale con valori densitometrici di T-score <-2.5 SD, valore che rappresenta quindi la soglia per diagnosticare la presenza di osteoporosi.

L'OMS, nell'interpretare i risultati della BMD, adotta le seguenti definizioni:

- La BMD *normale* è definita da un *T-score* compreso fra +2,5 e -1,0. La BMD del paziente, si colloca cioè fra 2,5 deviazioni standard (DS) sopra la media e 1 DS sotto la media di un giovane adulto sano dello stesso sesso.
- L'*osteopenia* (bassa BMD) è definita ad un *T-score* compreso tra -1,0 e -2,5 DS.
- L'*osteoporosi* è definita da un *T-score* inferiore a -2,5 DS.
- L'*osteoporosi conclamata* è definita da un *T-score* inferiore a -2,5 DS con la contemporanea presenza di una o più fratture da fragilità ossea (Adami et al. 2009).

Epidemiologia dell'osteoporosi

Sulla base dei criteri diagnostici definiti dall'OMS, circa il 6% degli uomini e il 22% delle donne di età compresa tra 50-84 anni presenta osteoporosi, che colpisce in totale 27,6 milioni di uomini e donne nell'UE (Hernlund et al. 2013).

Riferendoci all'Italia, dati del 2009 ci mostrano che circa 3,5 milioni di donne e circa 1 milione di uomini sono affetti da osteoporosi. Poiché nei prossimi 20 anni la percentuale della popolazione italiana al di sopra dei 65 anni d'età aumenterà del 25%, ci dovremo attendere un proporzionale incremento dell'incidenza dell'osteoporosi. All'età di 50 anni, la probabilità di incorrere in una di queste fratture è del 22% e del 46% in uomini e donne, rispettivamente (Adami et al. 2009).

L'osteoporosi provoca più di 8,9 milioni di fratture annualmente in tutto il mondo e più di un terzo di tutte le fratture osteoporotiche si verificano in Europa.

In Europa le fratture osteoporotiche si attestano intorno a 2 milioni unità/anno (Compston et al. 2009); nello specifico, nella popolazione italiana oltre i 50 anni d'età, il numero di fratture di femore è superiore alle 80.000 unità/anno mentre le fratture vertebrali (per esempio crolli vertebrali, secondari a traumi minimi) sono state riscontrate in oltre il 20% dei soggetti con età superiore di 65 anni, in entrambi i sessi (Adami et al. 2009).

Se da una parte è vero che la sua incidenza aumenta con l'età (arrivando ad interessare la maggior parte della popolazione oltre l'ottava decade d'età) dall'altra bisogna ricordare che, poiché la distribuzione della densità minerale ossea nella popolazione giovane in buona salute è distribuita normalmente (De Laet et al. 2005) e la perdita di massa ossea si verifica con l'avanzare dell'età, la prevalenza di osteoporosi tende ad aumentare con l'età.

Le fratture osteoporotiche hanno importanti implicazioni sociali ed economiche oltre che sanitarie. In Italia, i pazienti con frattura del femore prossimale presentano nell'anno successivo alla frattura, un tasso di mortalità del 15-30%. Tra gli anziani le fratture osteoporotiche sono una delle maggiori cause di mortalità. Il 50% delle donne con frattura di femore presenta inoltre una consistente riduzione del livello di autosufficienza e, in circa il 20% dei casi, richiede una istituzionalizzazione a lungo termine (Adami et al. 2009).

Il numero di nuove fratture nel 2010 nell'UE è stato stimato pari a 3,5 milioni di casi, di cui circa 620.000 dell'anca, 520.000 vertebrali, 560.000 dell'avambraccio e 1.800.000 altre fratture (cioè bacino, costola, omero, la tibia, il perone, clavicola, scapola, sterno e altre fratture femorali). Due terzi di tutte le fratture si è verificato nelle donne.

Nel 2010, il numero di morti connesse alle fratture è stato stimato pari a 43.000 casi di cui circa il 50% dei decessi, nelle donne, erano dovuti a fratture dell'anca, il 28% a fratture vertebrali cliniche e il 22%

ad altre fratture. Le percentuali corrispondenti per gli uomini erano del 47%, 39% e 14%, rispettivamente (Hernlund et al. 2013).

Eziopatogenesi delle fratture osteoporotiche

L'osteoporosi si manifesta con episodi fratturativi ma la definizione di "frattura da osteoporosi" non è semplice. Le opinioni divergono per quanto riguarda l'inclusione o l'esclusione di diversi siti di frattura nel descrivere le fratture osteoporotiche. Un approccio è quello di considerare tutte le fratture da traumi a bassa energia come osteoporotiche. "La bassa energia" può essere definita come una caduta da un'altezza da in piedi o meno, oppure come trauma che in un individuo sano non darebbe luogo a fratture (Kanis et al. 2013). Questa caratterizzazione indica che la stragrande maggioranza delle fratture dell'anca e dell'avambraccio sono lesioni a basso consumo energetico o fratture da fragilità (Mackey et al. 2007)(Sanders et al. 1998). La considerazione di bassa energia ha il merito di riconoscere la causalità multifattoriale della frattura, ma persone affette da osteoporosi hanno maggiori probabilità di rottura rispetto alle loro controparti normali in seguito anche a lesioni ad alta energia (Sanders et al. 1998).

Inoltre bisogna ricordare che le fratture osteoporotiche più comuni comprendono fratture vertebrali, fratture dell'avambraccio, fratture dell'anca e fratture dell'omero prossimale, delle clavicole e delle pelvi (World Health Organization 1994); mentre non sono considerate osteoporotiche le fratture a carico di dita, piedi e fratture facciali.

L'osteoporosi e la frattura osteoporotica hanno una patogenesi multifattoriale. Alcuni di questi fattori aumentano il rischio fratturativo mediante la riduzione della massa ossea e risultano utili per identificare i soggetti da sottoporre a screening densiometrico; tra questi troviamo: sesso femminile, menopausa precoce, amenorrea primaria o secondaria, eccessivo consumo di alcolici, immobilizzazione protratta, basso introito di Ca e carenza di vitamina D (Adami et al. 2009).

Altri fattori, invece, aumentano il rischio di frattura osteoporotica con meccanismi totalmente indipendenti dalla BMD, utili per ragioni prognostiche e per definire la soglia di intervento terapeutico; tra questi troviamo: età, storie di fratture atraumatiche, trattamento cortisonico, elevato turnover osseo, familiarità per fratture al femore, scarsa acuità visiva, basso peso corporeo, malattie neuromuscolari e fumo di sigaretta (Adami et al. 2009).

Fisiopatologia

L'osso è in continuo rimodellamento e riassorbimento. Normalmente, formazione e riassorbimento osseo sono strettamente equilibrati. Gli osteoblasti (cellule che producono la matrice organica dell'osso e quindi la mineralizzazione ossea) e gli osteoclasti (cellule che riassorbono l'osso) sono regolati dal paratormone, dalla calcitonina, dagli estrogeni, dalla vitamina D, da varie citochine e da altri fattori locali come le prostaglandine.

Il picco di massa ossea negli uomini e nelle donne si ha intorno ai 30 anni. I soggetti di colore raggiungono il picco più elevato di massa ossea rispetto ai bianchi e agli asiatici, invece gli ispanici presentano valori intermedi. Gli uomini hanno una massa ossea maggiore delle donne. Dopo aver raggiunto il picco, la massa ossea rimane stabile ai valori massimi per circa 10 anni, durante i quali la

formazione ossea è all'incirca pari al riassorbimento. Dopo questo periodo, si verifica perdita di massa ossea a un tasso annuale dello 0,3-0,5%/anno circa. All'inizio della menopausa, la perdita di tessuto osseo aumenta nelle donne fino a valori di 3-5%/anno circa, per 5-7 anni, dopo cui la percentuale di perdita decresce.

La perdita di massa ossea da osteoporosi colpisce l'osso corticale e trabecolare (spongioso). Lo spessore dell'osso corticale, il numero e le dimensioni delle trabecole si riducono, portando a un aumento della porosità. Le trabecole possono essere interrotte o del tutto assenti. La perdita dell'osso trabecolare si verifica più rapidamente rispetto all'osso corticale, perché l'osso trabecolare è più poroso e il suo turnover osseo è più elevato. Tuttavia, la perdita di entrambi i tipi contribuisce alla fragilità scheletrica.

Classificazione

L'osteoporosi si può sviluppare come una patologia primaria o secondaria ad altri fattori. I siti di frattura sono simili sia nell'osteoporosi primaria che in quella secondaria.

Osteoporosi primaria

Più del 95% di osteoporosi nelle donne e circa l'80% negli uomini sono primarie e, quindi, senza una causa sottostante identificabile. La maggior parte dei casi si verifica nelle donne in postmenopausa e negli uomini anziani. Tuttavia, alcune condizioni possono accelerare la perdita ossea nei pazienti con osteoporosi primaria. L'insufficienza gonadica è un fattore importante sia negli uomini sia nelle donne; altri fattori comprendono diminuita assunzione di calcio, bassi livelli di vitamina D, determinati farmaci, e iperparatiroidismo. Alcuni pazienti hanno un insufficiente apporto di calcio durante lo sviluppo osseo durante l'adolescenza e, quindi, non raggiungono mai il picco di massa ossea.

Il principale meccanismo di perdita ossea è un aumentato riassorbimento osseo, che risulta nella diminuzione della massa ossea e nel deterioramento della microarchitettura, ma a volte la formazione ossea è compromessa. I meccanismi della perdita ossea possono comportare i seguenti:

- i cambiamenti locali nella produzione delle citochine, in particolare quelli che coinvolgono le citochine come l'attivatore del recettore del fattore nucleare kappa-B ligando inibitore che aumenta il riassorbimento osseo promuovendo la differenziazione e la maturazione degli osteoclasti
- alterata risposta di formazione durante il rimodellamento osseo, probabilmente causata dal declino relativo all'età del numero e dell'attività degli osteoblasti, in parte correlata agli sviluppi citochino-mediati nella proteina sclerostina.
- altri fattori che influenzano il riassorbimento osseo come l'ormone paratiroideo e la vitamina D
- le fratture da fragilità raramente si verificano in bambini, adolescenti, donne in premenopausa, o uomini < 50 anni con normale funzione gonadica e senza alcuna causa secondaria, anche in quelli con ridotta massa ossea (Z-score valutati con la densitometria ossea con tecnica di assorbimento a RX [DXA]). Tali rari casi sono considerati osteoporosi idiopatica.

Osteoporosi secondaria

L'osteoporosi secondaria è responsabile di < 5% dei casi di osteoporosi nelle donne e del 20% circa negli uomini. Le cause possono anche accelerare ulteriormente la perdita di tessuto osseo e aumentare il rischio di frattura in pazienti affetti da osteoporosi primaria.

Le ragioni per cui i pazienti affetti da insufficienza renale cronica hanno una bassa massa ossea possono essere varie, tra cui l'iperparatiroidismo secondario, il fosforo sierico elevato, la deficienza di calcitriolo, le anomalie nei livelli di calcio sierico e nella vitamina D, l'osteomalacia e i problemi di bassa rotazione dell'osso (malattia adinamica dell'osso).

Fattori di rischio

Per la crescita ossea sono necessarie sollecitazioni meccaniche, compreso il carico, poiché l'immobilizzazione o prolungati periodi di sedentarietà provocano una perdita di tessuto osseo. Un basso indice di massa corporea predispone alla riduzione della massa ossea. Alcune etnie, tra cui bianchi e asiatici, hanno un rischio maggiore di osteoporosi. L'insufficiente apporto dietetico di calcio, fosfato, magnesio e vitamina D predispone alla perdita di tessuto osseo, come del resto l'acidosi endogena. Anche l'uso di tabacco e alcol influenza negativamente la massa ossea. Anche una storia familiare di osteoporosi, in particolare una frattura dell'anca nei genitori, aumenta il rischio. I pazienti che hanno avuto una frattura da fragilità hanno un elevato rischio di avere altre fratture cliniche (sintomatiche) e fratture clinicamente asintomatiche come le fratture vertebrali da compressione (Bolster, 2021).

Sintomatologia

I pazienti con osteoporosi sono asintomatici a meno che non si verifichi una frattura. Le fratture non vertebrali sono tipicamente sintomatiche, ma circa due terzi delle fratture vertebrali da compressione sono asintomatiche (anche se i pazienti possono avere mal di schiena cronico sottostante dovuto ad altre cause come l'artrosi). Una frattura vertebrale da compressione sintomatica inizia con un dolore acuto che in genere non si irradia, è aggravato dal carico, può essere accompagnato da dolenzia dei punti spinali, e in genere inizia a recedere in 1 settimana. Il dolore residuo può durare per mesi o restare costante, in tal caso si devono sospettare ulteriori fratture o disturbi di base alla colonna vertebrale.

Le fratture multiple delle vertebre toraciche possono infine causare cifosi dorsale, con accentuazione della lordosi cervicale. La sollecitazione anomala di muscoli e legamenti spinali può causare dolore cronico, tedioso, persistente, in particolare alla regione lombare. I pazienti possono avere dispnea a causa del ridotto volume intratoracico e/o senso di sazietà precoce dovuto alla compressione della cavità addominale quando la gabbia toracica si avvicina al bacino.

La malattia parodontale

Epidemiologia della malattia parodontale

La parodontite è la malattia infiammatoria cronica non trasmissibile più comune nell'uomo. Secondo lo studio Global Burden of Disease 2010, la prevalenza globale della parodontite grave, standardizzata per età, nel ventennio 1990-2010 è stata dell'11,2%, rappresentando così la sesta patologia più diffusa al mondo (Kassebaum NJ B. T., 2014). L'incidenza standardizzata per età delle forme gravi nel 2010 è stata di 701 casi su 100.000 persone per anno, con un trend simile al 1990. La prevalenza è aumentata gradualmente con l'età, mostrando un forte aumento tra la terza e la quarta decade di vita, con un picco di incidenza a circa 38 anni di età. All'interno di questo trend, esistono notevoli variazioni geografiche, che comunque sollecitano una grande attenzione da parte dei policymaker sanitari. In studi più recenti, la prevalenza globale della parodontite grave è stata stimata nel 7,4% della popolazione mentre la prevalenza di forme più lievi può affliggerne il 50% (Kassebaum NJ S. A., 2017). Recentemente in Italia è stato eseguito uno studio epidemiologico per valutare la prevalenza della parodontite in una popolazione adulta urbana del Nord Italia (Aimetti M, 2015). In questo studio orizzontale è stato selezionato un adeguato campione rappresentativo della popolazione adulta della città di Torino. Circa 1600 individui, di età compresa tra 20 e 75 anni, sono stati selezionati e 736 soggetti hanno accettato di partecipare alla raccolta dei parametri clinici (47% dei soggetti campionati). La stima di prevalenza di

parodontite grave e di parodontite moderata erano, rispettivamente, del 34,94% (95% CI: 31,23-38,74) e del 40,78% (95% CI: 36,89-44,79). La probabilità di parodontite è aumentata nei fumatori (OR aggiustato 2,06, 95% CI: 1,26-3,37, $p = 0,004$) e con l'età ma si è stabilizzata nel gruppo di età superiore ai 50 anni ($p < 0,001$) (Raspini M., 2021).

Eziopatogenesi della malattia parodontale

Il termine Malattia Parodontale o Parodontite identifica la patologia orale comunemente conosciuta come "piorrea" e tecnicamente definita come "perdita dell'attacco parodontale". In un primo tempo si manifesta con un quadro clinico di gengivite marginale (gengive sanguinanti, arrossate, tumefatte e dolenti).

La parodontite è una malattia infiammatoria multifattoriale nella quale l'infezione batterica dei tessuti parodontali costituisce la causa sufficiente e necessaria allo sviluppo e la progressione della patologia orale. Vi sono poi tutta una serie di concause quali ad esempio fumo, variazioni ormonali, malattie endocrine e sistemiche, norme igieniche, che associate alla presenza dei patogeni parodontali, sono in grado di favorire ed accelerare notevolmente l'evoluzione in senso negativo della parodontopatia. L'attacco parodontale collega la radice dei denti alla corticale dell'osso alveolare permettendo ai medesimi di avere stabilità e funzione corretta.

Si tratta di una malattia cronica a eziologia polimicrobica e sito specifica che colpisce i tessuti di sostegno dei denti: il cemento radicolare, l'osso alveolare, il legamento parodontale e la gengiva. Per quanto riguarda la distribuzione tra i sessi le donne risultano essere più colpite degli uomini; per il resto la malattia ha una diffusione ubiquitaria, anche se con specifiche predilezioni etniche e geografiche (influenti sono la razza e/o l'etnia, il background genetico, l'ubicazione geografica, i costumi sociali, lo status socio-economico, le pratiche alimentari di una popolazione).

La presenza dei batteri a livello della gengiva marginale attiva la risposta immunitaria dell'ospite: i capillari si dilatano, aumenta il flusso sanguigno, afferiscono i globuli bianchi che, nella messa in opera del meccanismo di difesa, provocano attivazione di sistemi immunologici (interleuchine etc.) ed enzimatici (collagenasi) a cascata il cui funzionamento incontrollato attiva un distacco ed ad una distruzione delle fibre marginali che normalmente connettono la gengiva alla superficie radicolare.

Così il solco gengivale, punto dove la gengiva produce una sorta di "anello fibroso-mucoso" che fa da barriera per impedire il passaggio batterico, e che normalmente ha una profondità massima di 2 millimetri, va gradualmente approfondendosi, e mano a mano che progredisce il fenomeno di distruzione delle fibre parodontali, si trasforma in una tasca parodontale. Si assiste contemporaneamente ad un marcato incremento della quota di batteri anaerobi obbligati che trovano proprio nella tasca parodontale, in assenza di ossigeno, il loro habitat ideale. Dunque il quadro clinico di infiammazione gengivale una volta instaurato e non trattato evolverà inevitabilmente, in una manifesta parodontite, caratterizzata dalla distruzione delle fibre e del tessuto osseo. La prima manifestazione clinica della parodontite, osservabile direttamente dal paziente, è il sanguinamento gengivale spontaneo o provocato dallo spazzolamento.

La perdita volumetrica delle papille, la recessione gengivale, un aumento della sensibilità al caldo o al freddo ed un cambiamento anche se lento e modesto di posizione dei denti, sono segni di parodontite di media gravità.

Una maggiore velocità di spostamento dei denti, con mobilità percepita dal paziente come anomala, e l'apertura repentina di spazi interdentali (diastemi) fino allo sventagliamento degli elementi frontali, sono indice di riacutizzazione della parodontopatia, con passaggio ad una fase avanzata.

L'alitosi è un'altra fastidiosa e socialmente invalidante conseguenza della parodontite, causata dal metabolismo di alcuni batteri presenti nella bocca.

All'esame obiettivo del cavo orale il dentista può osservare lesioni (tasche) di varia profondità, misurate tramite uno strumento sottile a punta arrotondata chiamato sonda parodontale (Network, 2021).

Il microbiota orale

Ogni zona del corpo umano è colonizzata da una popolazione microbica caratteristica, definita microbiota, che tipicamente convive in armonia con l'ospite.

Il microbiota orale fu inizialmente identificato nel 1670 da Antony van Leeuwenhoek, il quale dichiarò alla British Royal Society che varie forme di microbi erano presenti sotto forma di placche sulla superficie dei denti. Sfortunatamente tuttavia, dovettero passare 200 anni prima che venisse formulata una teoria sistematica che mostrasse come il microbiota orale fosse coinvolto nella patogenesi delle malattie del cavo orale. Il dentista americano W.D. Miller iniziò l'associazione tra il microbiota orale e le patologie del cavo orale in un piccolo laboratorio di Berlino alla fine del diciannovesimo secolo; egli fu spinto anche dai risultati di R. Koch che nello stesso periodo raccolse le prime evidenze dell'associazione tra la presenza di microbi e le patologie infettive.

Nell'arco degli anni successivi e fino ad oggi, sono state identificate più di 700 specie batteriche diverse nella cavità orale, che costituiscono il microbiota orale (Krzysciak W., 2016) .

Di norma, la bocca ospita un'ampia varietà di specie microbiche, inclusi funghi, virus, protozoi, archea e batteri. Tra i funghi, i più rappresentati sono le specie del genere *Candida*, le quali possono causare una gran varietà di infezioni acute e croniche ma che normalmente restano asintomatiche in circa la metà della popolazione (William D., 2011).

Anche un'ampia gamma di virus si ritrovano a livello della bocca. Tra questi, Herpes simplex può causare delle infezioni primarie sub-cliniche in molti individui già da neonati, che poi si sviluppano in stomatiti gengivali una volta bambini (Arduino P.G., 2008).

Due protozoi, *Entamoeba gingivalis* e *Trichomonas tenax* sono spesso riscontrati nel cavo orale (Wantland W.W., 1958). Generalmente, si comportano da innocui saprofiti, nutrendosi di detriti di cibo e batteri, tuttavia il loro numero risulta aumentato nei pazienti affetti da parodontite (Trim R.D., 2011).

Batteri ed Archea sono tuttavia le specie microbiche maggiormente rappresentate nella bocca, infatti la saliva umana ne arriva a contenere circa 100 milioni per mL. Tutte le superfici buccali sono ricoperte da un biofilm batterico il quale si trova sia sulle gengive sia sui denti ed è responsabile delle due più diffuse patologie ad eziologia batterica nell'uomo: la carie dentale e la malattia parodontale.

Il metodo principale di caratterizzazione delle specie microbiche che abitano il cavo orale si è rivelato essere inizialmente la coltura su media di coltura artificiali. Tuttavia, ciò non si è rivelata una prassi semplice; infatti i batteri del cavo orale tendono ad avere una crescita molto lenta e ad essere esigenti dal punto di vista nutrizionale, oltre ad essere spesso sensibili alla presenza di ossigeno. Circa la metà delle specie batteriche isolate dalla bocca si è rivelata essere incapace di crescere su substrati artificiali. Questo risultato ha fatto sì che venissero predisposti dei metodi indipendenti dai mezzi di coltura per analizzare tali specie.

Queste tecniche sono basate sull'analisi della molecola di RNA ribosomiale (r-RNA) della sub-unità minore (16 S) ribosomiale. Poiché i ribosomi hanno il ruolo essenziale nella cellula di tradurre le molecole di m-RNA in proteine e l'r-RNA è un componente strutturale dei ribosomi, si è evoluto

lentamente nel tempo e possiede regioni altamente conservate rispetto ad altre regioni più variabili che sono caratteristiche delle varie specie individuali. L'allineamento e la comparazione delle sequenze degli r-RNA 16 S da differenti microrganismi ci permette quindi la costruzione di alberi filogenetici che rappresentano le loro relazioni evolutive (Giovannoni S.J., 1990). Un avanzamento ulteriore delle tecniche di riconoscimento microbico si è avuto grazie all'adozione del sequenziamento ad elevata portata tramite pirosequenziamento. Nel sistema 454 (Roche), i geni delle sub-unità 16 S sono amplificati tramite PCR da campioni contenenti primers universali e successivamente mescolati in eguali proporzioni. Il composto viene poi amplificato in un'emulsione e distribuito in dei pozzetti su delle piastre in cui vengono aggiunte delle microsferi contenenti i reagenti per il sequenziamento (Rothberg J.M., 2008).

Sulla base di queste tecniche è stato creato un database di tutte le specie batteriche orali conosciute ad oggi, l'Human Oral Microbiome Database, www.homd.org, (Chen T., 2010); questo database include la descrizione di tutti i taxa attualmente conosciuti.

Differenti tipologie di microrganismi, inclusi aerobi obbligati, facoltativi e anaerobi obbligati sono rappresentati all'interno del cavo orale.

La comunità batterica orale è dominata dalle specie appartenenti ai Phyla Firmicutes, Bacterioides, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaete e Fusobacteria, che compongono così il 96% delle specie individuate (Dewhirst F.E., 2010).

Essendo la bocca un sistema aperto e frequentemente esposto alla colonizzazione da batteri esogeni che si trovano nei cibi, nelle acque, nell'aria, definire la precisa composizione del microbiota orale risulta molto complesso. Inoltre, per l'uomo bisogna considerare anche l'effetto dei contatti sociali, come ad esempio i baci. Tuttavia, sembra essere molto difficile che batteri esogeni possano generare una colonizzazione persistente della cavità orale; questo probabilmente perché queste specie esogene deficitano nella presenza di adesine e recettori che rendono possibile il legame alle superfici del cavo orale o la co-aggregazione con altre specie batteriche.

Inoltre, potrebbe anche esserci una esclusione di tali specie esogene da parte del sistema immunitario. L'evidenza di questo meccanismo è data dal fatto che coliformi intestinali sono difficilmente riscontrabili nel cavo orale, mentre si ritrovano spesso in soggetti immuno-compromessi o in quelli con un ridotto flusso salivare (Jobbins J., 1992) (MacFarlane TW, 1974).

I batteri commensali giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento della salute sistemica e del cavo orale. I commensali dell'intestino ad esempio, sono riconosciuti come un'entità essenziale per il mantenimento delle strutture tissutali e per partecipare alla risposta immunitaria locale e sistemica.

A livello della bocca, la semplice presenza del microbiota orale commensale inibisce la colonizzazione da parte di batteri patogeni attraverso il meccanismo della resistenza alla colonizzazione (Vollard EJ, 1994). Poiché infatti tutte le superfici della bocca sono colonizzate da batteri commensali, restano pochi siti di attacco disponibili per i patogeni. Alcuni batteri commensali hanno inoltre mostrato capacità antagonistiche nei confronti di specie patogene; ad esempio *Streptococcus salivarius* produce delle batteriocine che sono in grado di inibire la crescita dei batteri Gram negativi che sono associati all'insorgenza della parodontite (Wescombe P.A., 2009).

L'importanza di questo meccanismo è ben mostrata quando il microbiota commensale viene disgregato, per esempio grazie all'uso di antibiotici (Sullivan A, 2001); in questi casi si manifestano spesso infezioni

opportunistiche da parte di specie di *Candida* o *Staphylococcus aureus* ed altre specie microbiche che possono portare all'insorgenza del meccanismo eziopatogenetico della malattia parodontale.

Microbiologia parodontale

A tutt'oggi non siamo ancora completamente in grado di definire totalmente quali sono le specie microbiche coinvolte nella patogenesi della parodontite. I motivi principali sono i seguenti:

- la complessità del microbiota sottogengivale, che può arrivare a contenere tra le 30 e le 1000 specie microbiche;
- i campioni raccolti dalle tasche parodontali possono risultare non rappresentativi dell'intera tasca;
- la difficoltà nella coltura dei microrganismi residenti nelle placche sottogengivali; molte specie infatti risultano difficili da coltivare o identificare;
- l'infezione può esser dovuta a più specie microbiche;
- le specie microbiche opportuniste possono colonizzare l'ambiente della lesione creata dai patogeni e le loro concentrazioni possono aumentare assieme a quelle dei veri patogeni;
- il campione di placca analizzabile dovrebbe essere raccolto nel momento di maggiore attività della patologia;
- la parodontite può presentarsi in diverse forme che non sempre sono pienamente distinguibili. Una classificazione sbagliata può condurre a valutazioni microbiologiche sbagliate;
- vi sono persone che presentano cariche batteriche di batteri patogeni molto basse, senza avere una malattia manifesta;
- alcuni ceppi patogeni possono mostrare una maggiore virulenza di altri, avendo inglobato elementi genetici che li rendono maggiormente invasivi, aderenti e resistenti agli antibiotici.

Fattori di virulenza dei patogeni parodontali

La virulenza si riferisce alla capacità di un microbo di esprimere patogenicità e consiste in una complessa interazione tra il microrganismo, l'ospite e l'ambiente. Poulin e Combs hanno definito il concetto di virulenza in termini di "fattori di virulenza", ovvero di molecole prodotte dal microrganismo, che quando presenti, provocano un danno all'ospite, ma quando assenti perché mutati per esempio, questa capacità risulta compromessa (Poulin, 1999). Questa mutazione non influenza la capacità del microrganismo di crescere e riprodursi. Quindi, i fattori di virulenza possono avere una moltitudine di funzioni (Holt, 2000, 2005):

- la capacità di indurre interazioni microbo-ospite;
- la capacità di invadere l'ospite;
- la capacità di crescere nella cellula ospite;
- la capacità di eludere/interferire con le difese dell'ospite.

Principali microrganismi patogeni coinvolti nella malattia parodontale

E' stato dimostrato che diversi agenti patogeni sono coinvolti nella malattia parodontale distruttiva. Di seguito ne vengono descritti alcuni dei più importanti.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Durante gli ultimi due decenni, è stato dimostrato che *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* può essere considerato come un importante agente patogeno nelle malattie parodontali distruttive (Slots

J. D., 1990) (Slots J. a., 2000, 1999) (van der Reijden, 2008). La specie è rappresentata da sei sierotipi (a-f). Il sierotipo b è più frequente in lesioni parodontali attive, mentre i sierotipi a e c hanno una forte associazione con la salute parodontale. Il sierotipo b è più spesso associato alla parodontite aggressiva rispetto a quella cronica. Il sierotipo b è stato anche trovato più frequentemente nei soggetti con parodontite di età inferiore ai 18 anni (60,9 %) rispetto a soggetti di età superiore a 35 anni (29 %). La distribuzione globale dei diversi sierotipi di *A. actinomycetemcomitans* non è omogenea, il che implica che l'associazione tra il sierotipo e lo stato di salute parodontale può dipendere dalla posizione geografica e/o dall'etnia della popolazione di studio (Fine D. e., 2007). *A. actinomycetemcomitans* è stato inizialmente identificato come patogeno parodontale negli studi di parodontite aggressiva localizzata (LAP). La malattia parodontale distruttiva ad insorgenza precoce è spesso associata con *A. actinomycetemcomitans*, tantoché la prevalenza di tale microorganismo in questo gruppo di pazienti è del 40-100%. *A. actinomycetemcomitans* è anche associato con le lesioni parodontali nei pazienti con sindrome di Papillon-Lefèvre, i quali mostrano una diminuita funzione dei monociti, dei neutrofili e linfociti, parzialmente causata da infezione da citomegalovirus. Anche nella popolazione adulta con parodontite tale microorganismo è molto frequente (30-40%) e la proporzione del microbiota sottogengivale comprendente *A. actinomycetemcomitans* aumenta notevolmente con l'aumentare della profondità di sondaggio parodontale e con l'attivazione della malattia stessa (Mandell, 1984). *A. actinomycetemcomitans* sembra essere particolarmente frequente nelle lesioni parodontali refrattarie, possibilmente a causa della capacità dell'organismo di invadere il tessuto gengivale e quindi di eludere gli sforzi per la pulizia operati dal dentista e dal paziente. *A. actinomycetemcomitans* è stato dimostrato di possedere una miriade di fattori di virulenza che aumentano la sua sopravvivenza nella cavità orale e gli consentono di eludere le strategie protettive dell'ospite (Fives-Taylor, 2000, 1999). Molti di questi fattori di virulenza possono essere coinvolti nella patogenesi della parodontite e includono:

- Fattori che favoriscono la colonizzazione e la persistenza nella cavità orale: adesine invasive, batteriocine, la resistenza agli antibiotici;
- I fattori che interferiscono con le difese dell'ospite: leucotossina, inibitori chemiotattici, proteine immunosoppressive, proteine leganti la porzione Fc degli anticorpi;
- Fattori che distruggono i tessuti dell'ospite: citotossine, collagenasi, agenti che stimolano il riassorbimento osseo, stimolatori dei mediatori di infiammazione;
- I fattori che inibiscono la riparazione dei tessuti dell'ospite: inibitori della proliferazione dei fibroblasti, inibitori della formazione ossea.

Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis è il secondo patogeno parodontale molto studiato. La maggior parte degli autori concorda sul fatto che i bambini e gli adolescenti con parodonto sano hanno una carica molto bassa, o addirittura non sono portatori di *P. gingivalis* nel microbiota sottogengivale. *P. gingivalis* è una specie descritta nel 37-63% dei pazienti affetti da parodontite giovanile localizzata; tuttavia, l'organismo rappresenta solo una piccola parte del microbiota nelle fasi iniziali della malattia. Al contrario, *P. gingivalis* è un microorganismo predominante nella parodontite giovanile generalizzata e può assumere un importante significato patogenetico nella malattia. Il 40-100% dei pazienti adulti con parodontite può ospitare il microorganismo, con proporzioni crescenti nelle tasche parodontali profonde (Ready, 2008) e attive (Slots J. e., 1986). Diversi studi hanno suggerito che la prognosi

del trattamento parodontale è migliore se alcuni agenti patogeni, in particolare *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, non vengono più rilevati dopo la terapia (Haffajee A. J., 1988) (Haffajee A. e., 1988) (Rodenburg, 1990), e che i siti positivi sono a maggior rischio di recidive (Fine D. , 1994) (Rams, 1996) (Brochut, 2005). Nonostante il fatto che il trattamento parodontale meccanico non chirurgico e il controllo della placca realizzato autonomamente siano efficaci nel ridurre il numero di *P. gingivalis* in un sito, *Prevotella intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* tendono a ristabilirsi rapidamente nella maggior parte dei soggetti, quindi il controllo efficace della placca è costantemente richiesto (Doungudomdacha, 2001) (Johnson, 2008).

Tannerella forsythia

T. forsythia è il secondo elemento del complesso rosso definito da Socransky e collaboratori (Socransky, 1998), il cui ruolo preciso nella grave distruzione ossea e tissutale rimane da stabilire a causa delle sue esigenze di crescita (Tanner, 2006). Questo microrganismo è stato spesso isolato insieme a *P. gingivalis* da casi di parodontite cronica attiva, ed è stato frequentemente associato a malattie parodontali severe, refrattarie, precoci. I fattori di rischio per la parodontite in cui è maggiore la frequenza di rilevamento di *T. forsythia* sono da ricercare soprattutto nel fumo. *T. forsythia* sembra invadere la tasca parodontale con *P. gingivalis* (e *T. denticola*), e insieme queste specie possono produrre molecole ad attività apoptotica che impediscono ai globuli bianchi dell'ospite di esercitare la propria azione protettiva (Holt, 2000, 2005).

Treponema denticola

T. denticola è un membro dei treponemi orali e la sua presenza si osserva solo in caso di parodontite (Sakamoto, 2005). Gli studi di Socransky e collaboratori hanno sottolineato la convivenza di specie batteriche orali che si raggruppano in cluster e si succedono, determinando la progressione della malattia parodontale e la gravità. Il cluster composto dalle specie altamente proteolitiche *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *T. denticola*, il cosiddetto "complesso rosso", è fortemente associato con la parodontite avanzata e progressiva (Ellen, 2005). Elevati livelli di *T. denticola* sono stati identificati insieme ad una dozzina di altre specie in siti contenenti solfuri, i cui livelli nelle tasche riflettono la percentuale di batteri presenti perché i solfuri sono rilasciati come prodotto finale del loro metabolismo (Ellen, 2005). I fattori di virulenza noti che determinano l'invasività dei treponemi sono le varie proteine coinvolte nella motilità flagellare e nella chemiotassi, le proteasi e le peptidasi (Ellen, 2005). I patogeni parodontali nel complesso proteolitico hanno la capacità di degradare componenti umani della matrice per migliorare la loro penetrazione nei tessuti e di quella delle specie vicine.

Fusobacterium nucleatum

F. nucleatum, che comprende le tre sottospecie (*nucleatum*, *vincentii*, e *polymorphum*), è un marker significativo di malattia parodontale distruttiva in soggetti adulti (Mosca, 2007) (Papapanou, 2002), si trova più spesso nei siti attivi (Dzink, 1988), ed è associato ai livelli più alti di solfuri nelle tasche di soggetti con parodontite cronica (Torresyap, 2003). Questo parodontopatogeno è coinvolto in una varietà di infezioni non orali come quelle pleuropolmonari, quelle del tratto urinario, endocarditi, e infezioni amniotiche (Grenier, 2006). La capacità di *F. nucleatum* di co-aggregarsi con molti altri

batteri della placca suggerisce che funge da “ponte” microbico tra i batteri che colonizzano negli stadi iniziali e quelli che occupano la tasca nelle fasi più avanzate. Inoltre, *F. nucleatum* è stato descritto come un importante organismo iniziatore perché promuove alterazioni chimico-fisiche del solco gengivale, e consente ai patogeni successivi di stabilirsi e proliferare. Un cambiamento importante associato all'insorgenza della malattia parodontale è l'alcalinizzazione del solco gengivale. L'ammoniaca prodotta dal metabolismo degli amminoacidi del fluido crevicolare gengivale e rilasciato dalla rottura dei tessuti dell'ospite porta ad un aumento del pH sopra 8, promuovendo così la proliferazione di batteri patogeni sensibili agli acidi. Inoltre, *F. nucleatum* altera la sua espressione genica in funzione del pH. Recentemente è stato inoltre suggerito che *F. nucleatum* faciliti l'invasione delle cellule dell'ospite da parte di *P. gingivalis* (Saito, 2008) e che la sua capacità di co-aggregazione per formare un biofilm può essere importante nella persistenza dell'organismo durante la transizione dallo stato di salute alla malattia (Zilm, 2007).

Prevotella intermedia

P. intermedia è un importante patogeno parodontale, significativamente prevalente in pazienti con parodontite cronica, parodontite aggressiva, parodontite distruttiva, gengivite in età puberale e gengivite ulcerativa necrotizzante acuta (Dahlen, 1990). *P. intermedia* è più frequente nelle tasche più profonde di 3 mm ed è strettamente correlato al BOP. Inoltre, i siti colonizzati sia da *T. forsythia* e da *P. intermedia* hanno una peggiore risposta al trattamento.

Campylobacter rectus

C. rectus è stato spesso rilevato nelle tasche sottogengivali profonde (Ihara, 2003), ed è stato implicato in casi di parodontite adulta, parodontite a progressione rapida, e parodontite associata con alcune condizioni come la gravidanza (Yokoyama, Effect of female sex hormones on *Campylobacter rectus* and human gingival fibroblasts., 2005) (Yokoyama, 2008), oppure associate ad altre malattie come AIDS e diabete (Zambon, 1990). Studi longitudinali suggeriscono che *C. rectus* è una delle specie principali che caratterizza i siti che passano dallo stato di salute alla malattia, ed i suoi livelli sono ridotti dopo il trattamento parodontale (Bostanci, 2007).

Eikenella corrodens

E. corrodens può essere causa anche di infezioni extra-orali, tra cui ascessi, endocardite, artrite, osteomielite, cheratite, congiuntivite e cellulite (Haffajee A. a., 2000). *E. corrodens* si trova prevalentemente nella placca sottogengivale dei pazienti con parodontite avanzata (Nonnenmacher, 2001) (Salari, 2004). La frequenza di rilevamento di *E. corrodens* dai solchi sottogengivali di pazienti affetti da parodontite adulta e giovanile è del 52% e 59% (Chen, 1989). In pazienti con parodontite, *E. corrodens* è correlato ai siti con malattia attiva sia prima che dopo terapia parodontale.

Il ruolo della nutrizione nella malattia parodontale

La correlazione tra nutrizione e malattia parodontale è piuttosto incerta per varie ragioni; tuttavia, benché si riconosca nella placca batterica dentale il principale agente eziologico della parodontite, una scorretta alimentazione può influire sull'insorgenza e il decorso della malattia.

Diversi studi hanno dimostrato l'influenza della placca dentale come principale fattore eziologico per l'infiammazione gengivale, rilevando un peggioramento della gengivite quando i partecipanti allo studio sospendevano le procedure di igiene orale (Loe H., 1965) (Brex MC., 1988) (Baumgartner S., 2009). Gli autori hanno quindi concluso che il protocollo di gengivite sperimentale non è applicabile se la dieta non include i carboidrati raffinati. Quindi la dieta risulterebbe avere una forte influenza sulla gengiva e sulla reazione infiammatoria parodontale. Le influenze riguarderebbero sia i meccanismi di riparazione tissutale sia quelli di difesa dell'organismo, i quali risentono di:

- diminuzione dell'attività fagocitaria dei granulociti;
- modificazione della risposta immunitaria;
- alterazioni nella sintesi di prostaglandine;
- variazioni epiteliali.

Una malnutrizione che compromette questi meccanismi provoca una reazione a livello tissutale che evolve in un aumento della permeabilità della mucosa orale, la cui integrità è fondamentale come elemento difensivo per il mantenimento della salute orale, assieme ad una risposta immunitaria ottimale, alla composizione della saliva e alla velocità del processo rigenerativo (Ritchie CS., 2003).

Tuttavia uno squilibrio alimentare non causare da solo la malattia parodontale, senza la presenza della placca batterica; può comunque influenzarne la gravità e l'estensione, alterando la resistenza dell'organismo ospite e la capacità rigenerativa dei tessuti.

Un gran numero di principi nutritivi hanno un impatto rilevante sulla salute parodontale; tra questi vanno distinti i macro elementi e i micro elementi.

Tra i macronutrienti (carboidrati, proteine e lipidi), estremamente importanti risultano i carboidrati, che risultano coinvolti nell'evoluzione della malattia parodontale associata alla carie dentale. L'eccessiva assunzione di carboidrati sembra promuovere la disbiosi orale; viceversa una riduzione di carboidrati sembra ridurre l'infiammazione gengivale. Inoltre, diete ricche di grassi saturi, che aumentano lo stress ossidativo, andrebbero evitate per prevenire l'insorgenza della parodontite (Varela-Lopez A., 2016). In questo caso un contenuto di grasso corporeo più elevato è stato associato a un aumento del sanguinamento gengivale nei pazienti più anziani; invece i grassi poli-insaturi (come gli omega 3) hanno mostrato un effetto positivo sulla salute del parodonto (RE., 2009). Altri studi invece condotti su modello animale sulla privazione di proteine hanno portato come risultato alla rottura dei legamenti parodontali, degenerazione dei tessuti gengivali e riassorbimento dell'osso alveolare (Chawla TN., 1951). Un altro studio ha invece suggerito una relazione inversa tra un'elevata assunzione proteica e la parodontite (Stahl SS., 1955).

Tra le raccomandazioni nutrizionali per mantenere il parodonto in salute troviamo in letteratura la riduzione del consumo di carboidrati e una supplementazione di acidi grassi omega 3, vitamina C, vitamina D, sostanze antiossidanti e fibre (Nielsen SJ., 2016). Studi in vitro hanno dimostrato che l'assunzione di vitamina C e D sembra svolgere un ruolo rilevante nella prevenzione della gengivite e dell'infiammazione parodontale (Najeeb S., 2016). Infine va segnalato anche il ruolo dell'apporto di sostanze antiossidanti dalla dieta che sembrano essere importanti nei processi coinvolti nella reazione sistemica allo stress ossidativo, mostrando effetti positivi sui tessuti parodontali (van der Putten GJ., 2009).

E' stato segnalato anche un forte legame tra malattia parodontale e obesità (Park JB., 2016), problema per lungo tempo sottovalutato. L'obesità infatti è stata documentata come un fattore di rischio per una

serie di malattie sistemiche con background infiammatorio; uno studio longitudinale ha individuato una correlazione positiva tra BMI e incidenza della malattia parodontale (Varela-Lopez A., 2016).

Principali nutrienti coinvolti nella salute del tessuto parodontale

Carboidrati

E' associato da tempo che l'assunzione di zucchero è il principale fattore coinvolto alla formazione della placca dentaria. Gli zuccheri vengono fermentati producendo vari tipi di acidi, che portano alla demineralizzazione della struttura dura del dente. In generale, il lattosio sembra essere lo zucchero meno cariogeno rispetto agli altri (Varela-Lopez A., 2016).

Vitamine

Molte vitamine sono indispensabili per il mantenimento dei tessuti parodontali.

Una delle più importanti è senz'altro la vitamina D; studi clinici suggeriscono che una carenza nella dieta di vitamina D porta ad infiammazione parodontale e ad un ritardo nella guarigione post-chirurgica (Nebel D., 2014).

La vitamina C è un altro importante fattore coinvolto nel mantenimento della salute del parodonto; una sua carenza provoca delle caratteristiche lesioni ai tessuti parodontali quali il sanguinamento e arrossamento delle gengive. Studi in vitro sembrano indicare che applicazioni locali di vitamina C e sale di magnesio diminuirebbero l'infiammazione a livello dei fibroblasti gengivali (Rekha C., 2012).

Proteine

In generale una carenza proteica, in presenza di lesioni parodontali, riduce la rapidità di rigenerazione del tessuto connettivale ed osseo, causando un ritardo nel processo di guarigione.

Minerali e oligoelementi

I principali risultano essere calcio, fosforo, potassio, zolfo, sodio, cloro e magnesio.

In minor quantità risultano importanti anche ferro, cobalto, rame, zinco, manganese, molibdeno, iodio, bromo e selenio.

La carenza di tutti questi elementi ha importanti implicazioni indirette sulla salute parodontale (Armitage GC., 2009) (Pihlstrom BL., 2005).

Il calcio in particolare è fondamentale per i tessuti calcificati quali ossa e denti. Una carenza di questo minerale può inficiare la salute del parodonto. Uno studio danese ha indicato che una maggiore assunzione di prodotti lattiero-caseari diminuisce la gravità della parodontite in età adulta (Adegboye ARA., 2012).

Obiettivi dello studio

Gli obiettivi dello studio proposto sono quindi:

- Studiare l'associazione fra la presenza di osteoporosi e la patologia parodontale.
- Esplorare le differenze quali-quantitative nella composizione del microbiota orale tra soggetti parodontici osteoporotici/osteopenici e non osteoporotici/osteopenici.

- Identificare le possibili connessioni tra particolari pattern alimentari e la composizione del microbiota orale e quindi l'eziopatogenesi della malattia parodontale e secondariamente dell'osteoporosi.

Endpoint

- L'analisi statistica di associazione sarà utilizzata per studiare la relazione tra le variabili cliniche legate alla patologia osteoporotica (t-score), e il grading della malattia parodontale.
- Tipizzazione delle specie microbiche parodontali a livello quali-quantitativo tramite l'utilizzo della Real-Time qPCR in presenza o assenza di diagnosi di osteoporosi.
- L'analisi statistica di associazione sarà utilizzata per studiare la relazione tra la composizione dei diversi nutrienti nella dieta (valutate tramite la somministrazione di uno specifico Food Frequency Questionnaire) rispetto alla composizione microbica orale (caratterizzato tramite PCR Real-Time) e alla malattia osteoporotica, ove presente.

Materiali e Metodi

Disegno dello studio

Studio prospettico, osservazionale No Profit monocentrico.

Popolazione in studio

Dopo aver ottenuto l'autorizzazione da parte del Comitato Etico, a cui è stato sottomesso specifico protocollo per approvazione, sono stati reclutati 110 soggetti affetti da parodontite, 71 osteoporotici/osteopenici e 39 non osteoporotici/osteopenici già caratterizzati a livello clinico dal personale medico della struttura odontoiatrica Excellence Dental Network (EDN) con sede a Firenze, struttura d'eccellenza per lo studio della patologia parodontale, esterna all'Università degli studi di Firenze, ma con la quale sono già in essere collaborazioni scientifiche.

Criteri d'inclusione

- Consenso informato alla partecipazione scritto e firmato.
- Età ≥ 18 anni, di ambo i sessi.
- Diagnosi di parodontite.

Criteri d'esclusione

- Terapie antibiotiche nei 3 mesi antecedenti l'arruolamento.
- Patologie paratiroidee o malattie legate al metabolismo osseo, fatta eccezione per l'osteoporosi.
- Soggetti che negli ultimi 5 anni hanno sviluppato patologie neoplastiche.
- Terapie steroidee.
- Disturbi del comportamento alimentare.
- Gravidanza

Lo studio è stato realizzato sulla base della routinaria valutazione ed intervento a cui sono normalmente sottoposti i pazienti afferenti all'istituto IRF In Microdentistry per la loro patologia.

Reclutamento e raccolta dei dati

Ai partecipanti, afferenti ai suddetti ambulatori della struttura odontoiatrica e aventi gli opportuni criteri d'inclusione per lo studio, è stato spiegato il progetto e sono stati consegnati i documenti relativi (Informativa paziente, Consenso informato alla partecipazione e Consenso al trattamento dei dati personali). Tutti i dati raccolti sono stati resi anonimi attraverso l'assegnazione di un codice alfanumerico specifico per ogni partecipante. I dati sono stati raccolti in un database elettronico e conservati per i fini espressi nella seguente ricerca scientifica.

Ai soggetti partecipanti allo studio sono stati somministrati due questionari attraverso i quali sono stati raccolti i dati anamnestici, tutte le informazioni relative alle patologie pregresse e ai fattori di rischio per l'insorgenza dell'osteoporosi e le informazioni sulle abitudini alimentari, con particolare riferimento all'apporto di calcio.

- Questionario per l'anamnesi fisio-patologica: è stato somministrato un questionario anamnestico appositamente redatto per il progetto al fine di rilevare informazioni fisio-patologiche dei soggetti e sullo stile di vita.

In particolare, sono state registrate le informazioni di seguito riportate:

Questionario anamnestico

Data ____/____/____

ID

1. DATI ANAGRAFICI

Risponda alle seguenti domande completando gli spazi dove richiesto; le risposte sono necessarie per l'esecuzione della prima visita; in ottemperanza alla legislazione vigente sono confidenziali, riservate al nostro archivio e protette dal segreto professionale. Nel caso riscontrate difficoltà nel compilare il questionario segnali il fatto al personale assistente che provvederà ad aiutarla.

- Nome e Cognome _____
- Codice fiscale _____
- Genere M F
- Data di nascita ____/____/____ Età _____
- Luogo di nascita _____
- Indirizzo di residenza _____ Città _____ CAP _____
- Tel abitazione _____ Tel lavoro _____ Cell _____
- Indirizzo e-mail _____

- Professione_____
- E' in possesso di un'assicurazione per il rimborso delle spese mediche? SI NO Quale_____
- Inviato presso questo studio da:
 - Passaparola
 - Web
 - Radio
 - TV
 - Stampa
 - Altro_____
- Per quale motivo è venuto da noi?
 - Visita di controllo
 - Dolore
 - Sanguinamento gengivale
 - Esigenze estetiche
 - Esigenze funzionali (masticazione)
 - Altro_____

Le risposte fornite sono corrette in base alle mie attuali conoscenze; mi impegno ad informare l'odontoiatra tempestivamente nel caso si verificassero cambiamenti nel mio stato di salute.

2. ANAMNESI MEDICA

Risponda alle seguenti domande completando gli spazi dove richiesto; le risposte sono necessarie per la programmazione del trattamento terapeutico; in ottemperanza alla legislazione vigente sono confidenziali, riservate al nostro archivio e protette dal segreto professionale. Nel caso riscontri difficoltà nel compilare il questionario segnali il fatto al personale assistente o al dentista che provvederanno ad aiutarla.

2.1 ANAMNESI ODONTOIATRICA

- Ha portato l'apparecchio ortodontico? SI NO
Se si, quando e per quanto tempo_____
- Ha familiari in cura presso le nostre strutture?
Se si, ci indichi il nome_____
- Si sente nervoso o agitato per la visita odontoiatrica? SI NO

- Ha già subito terapie odontoiatriche con anestetici locali? SI NO
 - Consente all'uso di anestetici locali? SI NO
 - Ha tendenza a sanguinare a lungo quando si taglia o ha notato lividi dopo un urto leggero? SI NO
 - Ha avuto complicanze in precedenti interventi chirurgici odontoiatrici (emorragia, sanguinamenti, infezioni)? SI NO
- Se sì, quali? _____

2.2 ANAMNESI FAMILIARE

- Familiarità per osteoporosi (es. anche se i genitori fanno terapie o se si sono fratturati)? SI NO

2.3 ANAMNESI FISIOLÓGICA

- Peso (Kg) autoriporato _____ Altezza (cm) autoriporato _____
- Con che tipo di parto è nato/a? NATURALE CESAREO
- E' nato/a di parto prematuro? SI NO Settimana di gestazione _____
- Assume latte, latticini, o acque ricche in calcio? SI NO
- Fuma? NO EX FUMATORE (N^ SIG/giorno; per quanti ANNI)
SI (N^ SIG/giorno; da quanti ANNI)
- Che tipo di alimentazione segue? ONNIVORA VEGETARIANA VEGANA
- Beve alcool? SI NO
- Se sì, più di 3 bicchieri di vino o birra al dì? SI NO
- La sua funzionalità intestinale è regolare?
SI NO STITICO DIARROICO ALTERNANTE

2.4 ANAMNESI PATOLOGICA

- Gode attualmente di buona salute? SI NO
- Soffre di disturbi legati al sonno? SI NO
- Presenta frequentemente astenia? SI NO
- Presenta dolori diffusi? SI NO
- Soffre di intolleranza al lattosio? SI NO
- Soffre di sensibilità al nickel? SI NO
- Soffre di malattia celiaca? SI NO
- Soffre di Gluten Sensitivity? SI NO
- Soffre di allergie alimentari? SI NO

SPECIFICARE _____

- Ha mai subito fratture? SI NO

SPECIFICARE tutti gli eventuali eventi fratturativi e spiegare

l'evento _____

- Ha mai subito interventi chirurgici? SI NO

SPECIFICARE _____

2.5 EVENTUALI COMORBIDITA' ASSOCIATE

- E' affetto da una delle seguenti patologie?
- Fibromialgia? SI NO

Primaria o secondaria? _____

- MALATTIE DEL RENE (calcolosi renale, ecc.) ? SI NO
Specificare _____
- CALCOLOSI BILIARE? SI NO
- MALATTIE REUMATICHE (artrosi, artrite, febbre reumatica)? SI NO
Specificare _____
- DIABETE? SI NO
Con insulina? SI NO
Valore della glicemia _____
- OSTEOPOROSI/OSTEOMALACIA? SI NO
Specificare _____
- DISTURBI DEL COMPORTAMENTO ALIMENTARE? SI NO
Specificare _____
- MALATTIE DELLA TIROIDE (ipotiroidismo, ipertiroidismo, ecc.)? SI NO
Specificare _____
- IPERPARATIROIDISMO? SI NO
- MALATTIE DELL'APPARATO DIREGENTE (gastrite, reflusso gastro-esofageo, ernia jatale, rettocolite ulcerosa, morbo di chron, ecc.)? SI NO
Specificare _____
- TUMORI SI NO
Specificare _____
- IPOGONADISMO? SI NO
- CUSHING? SI NO
- MIELOMA MULTIPLO? SI NO
- LINFOMI? SI NO
- EPATOPATIE? SI NO
Specificare _____

- MALATTIE DEL CUORE (infarto miocardio, valvulopatie, aritmie, pacemaker, ecc.)? SI NO
Specificare _____
- MALATTIE DEL SANGUE (anemia, leucemia, ecc.)? SI NO
Specificare _____
- MALATTIE EMORRAGICHE? SI NO
- IPERTENSIONE ARTERIOSA? SI NO
- MALATTIE POLMONARI? SI NO
Specificare _____
- MALATTIE DEL SISTEMA NERVOSO? SI NO
SPECIFICARE _____
- TBC? SI NO
- ALTRE MALATTIE NON ELENATE?
Specificare _____

2.6 TERAPIE

- Sta seguendo terapie farmacologiche (compresi anticoncezionali orali)? SI NO
SPECIFICARE tutte le terapie assunte (con i rispettivi dosaggi) e da quanto tempo

- Ha mai assunto farmaci per l'osteoporosi (farmaci e/o calcio e/o vitamina D)? SI NO
SPECIFICARE _____

- Ha mai assunto per più di 3 mesi cortisone? SI NO

- Fa uso di pre o probiotici? SI NO
SPECIFICARE _____

- Fa uso di altri integratori? SI NO
SPECIFICARE _____

- E' allergico a farmaci? SI NO
Se si, quali? _____

- Sta assumendo farmaci anticoagulanti? SI NO

Se si, quali? _____

- Sta assumendo farmaci inibitori di pompa (PPI)?

SI NO

Se si, quali? _____

3. ATTIVITA' FISICA

- Svolge attività fisica? SEDENTARIO NON SEDENTARIO REGOLARE
(nessuna attività) (30 min. al giorno) (3 o più ore a settimana)

4. PER LE DONNE

- Età menarca _____
- Età menopausa _____
- Terapia ormonale sostitutiva SI NO

Se si, per quanto tempo? _____

- Attualmente è in gravidanza? SI NO
Se si, in che mese _____
Ha avuto complicazioni nel corso della gravidanza? SI NO Quali? _____
- n° gravidanze precedenti _____
- Mesi di allattamento per ogni figlio _____

- Questionario sulle abitudini alimentari: si è provveduto alla somministrazione di un questionario di frequenza delle abitudini alimentari e dell'introito di calcio. E' stato somministrato un questionario di frequenza già validato da Montomoli et al (2002). Sono stati registrati anche supplementi e integratori eventualmente assunti. Il questionario è composto da 16 domande, relative all'assunzione di nutrienti. La selezione degli alimenti inseriti nel questionario si è basata sui dati dell'Istituto Italiano di Nutrizione, relativi alla composizione degli alimenti della dieta italiana, alla loro frequenza d'uso ed alla relativa importanza come fonte alimentare di calcio. Nel caso del gruppo alimentare dei formaggi sono presenti più domande per identificare meglio le tipologie consumate. Sono considerati tutti i principali gruppi di alimenti, infatti sono presenti domande che riguardano il consumo di cereali (pasta, riso, pane e simili e patate), di pesce-carne, di uova, di legumi, vegetali e frutta. Sono presenti anche due domande relative al consumo di dolci ricchi in calcio, comunemente consumati dalla popolazione italiana, come il gelato al latte ed il cioccolato al latte. Infine è stato accuratamente valutato anche l'apporto di calcio che possiamo avere grazie al consumo dell'acqua, che può rappresentare un'importante fonte di questo minerale. Un elenco delle più consumate acque minerali imbottigliate italiane ricche di calcio è stata allegata al FFQ. Per ogni domanda è stato anche chiesto di indicare le porzioni di prodotto consumato, identificando quantitativamente le porzioni in piccola, media o grande. Oltre all'apporto di calcio, attraverso il questionario si sono anche stimati gli introiti dei principali macro e micro nutrienti importanti per la salute delle ossa e dei denti oltre al calcio, ovvero carboidrati, proteine, lipidi, fosforo, sodio, ferro, magnesio, potassio, selenio, zinco, vitamina C, vitamina D, vitamina B12. I dati sono stati registrati in modo del tutto anonimo, attribuendo ad ogni soggetto un codice alfanumerico.

Questionario per la valutazione delle abitudini alimentari e dell'introito di calcio

- 1- LEI BEVE **LATTE DI VACCA**? Si No
Quanto? **A-** un bicchiere (125 mL) **B-** una tazza (250 mL) **C-** due tazze (500 mL)
Quante volte a settimana?.....
- 2- EI MANGIA **YOGURT**? Si No
Quanto? **A-** un vasetto (125 g) **B-** due vasetti (250 g) **C-** una confezione da 500 g
Quante volte a settimana?.....
- 3- LEI MANGIA **FORMAGGIO**? Si No
Quante volte a settimana?.....

Che tipo?:

3.1 FORMAGGIO A PASTA DURA (Parmigiano, Grana,...)? Si No

Quanto? **A-** porzione piccola (40 g) **B-** porzione media (80 g) **C-** porzione grande (120 g)
Quante volte a settimana?.....

3.2 FORMAGGIO A PASTA SEMI-DURA (Emmenthal, Provolone,...)? Si No

Quanto? **A-** porzione piccola (40 g) **B-** porzione media (80 g) **C-** porzione grande (120 g)
Quante volte a settimana?.....

3.3 FORMAGGIO A PASTA MOLLE (Mozzarella, Stracchino,...)? Si No

Quanto? **A-** porzione piccola (40 g) **B-** porzione media (80 g) **C-** porzione grande (120 g)
Quante volte a settimana?.....

3.4 RICOTTA? Si No

DI PECORA? DI MUCCA?

Quanto? **A-** porzione piccola (50 g) **B-** porzione media (100 g) **C-** porzione grande (200 g)
Quante volte a settimana?.....

4- LEI MANGIA **PASTA O RISO?** Si No

Quanto? **A-** porzione piccola (50 g) **B-** porzione media (100 g) **C-** porzione grande (150 g)
Quante volte a settimana?.....

- E CON QUANTI CUCCHIAINI DI **PARMIGIANO/GRANA?**

A- Nessuno **B-** 1 cucchiaino (5g) **C-** 2 cucchiaini (10 g) **D-** 3 cucchiaini (15 g)

5- LEI MANGIA **PANE** o simili (crackers, grissini,...)? Si No

Quanto al giorno? **A-** 100 g (=2 rosette) **B-** 200 g **C-** 300 g
Quante volte a settimana?.....

6- LEI MANGIA **PATATE?** Si No

Quante? **A-** porzione piccola (200 g= 2 patate medie)

B- porzione media (400 g)

C- porzione grande (600 g)

Quante volte a settimana?.....

7- LEI MANGIA **CARNE O PESCE?** Si No

Quanto? **A-** porzione piccola (100 g) **B-** porzione media (150 g) **C-** porzione grande (200 g)
Quante volte a settimana?.....

8- LEI MANGIA **UOVA?** Si No

Quante uova a settimana?

9- LEI MANGIA **LEGUMI** (fagioli, piselli,...)? Si No

Quanti? **A-** porzione piccola (80 g cotti – 1/3 di una lattina)

B- porzione media (150 g cotti – metà lattina)

C- porzione grande (250 g cotti – una lattina)

Quante volte a settimana?

10- LEI MANGIA **VERDURE?** Si No

Quante? **A-** porzione piccola (100 g) **B-** porzione media (200 g) **C-** porzione grande (300 g)

Quante volte a settimana?

- 11- LEI MANGIA **FRUTTA FRESCA**? Si No
Quanta a settimana?
- 12- LEI MANGIA **GELATO con latte** (eccetto sorbetto)? Si No
Quanto? A- porzione piccola (50 g) B- porzione media (100 g) C- porzione grande (150 g)
Quante a settimana?.....
- 13- LEI MANGIA **CIOCCOLATO AL LATTE O BIANCO**? Si No
Quanto? A- porzione piccola (25 g) B- porzione media (50 g) C- porzione grande (100 g)
Quante volte a settimana?.....
- 14- LEI BEVE **ACQUA MINERALE RICCA IN CALCIO** (vedi la lista)? Si No
Quanta al giorno? 0,500 L 0,750 L 1 L 1,5 L 2 L 2,5 L

Si è provveduto a trascrivere ed archiviare in un database opportunamente preparato ad hoc per lo studio tutti dati raccolti precedentemente dal personale qualificato dell'istituto IRF in Microdentistry e del laboratorio Biomolecular Diagnostic:

- massa ossea: i pazienti cui è stata consigliata dal personale odontoiatrico una valutazione del livello di densità minerale ossea, hanno eseguito un'analisi ultrasonografica (QUS) in sede di visita, utilizzata dal personale addetto come strumento di screening primario per valutare se inviare il soggetto verso una ulteriore indagine a livello mineralometrico. Nel caso di invio del soggetto verso una analisi mineralometrica (MOC), saranno registrati i valori della bone mineral density (BMD), T-score, lombari e femorali.
- marcatori ematici del metabolismo minerale: i pazienti cui è stata consigliata dal personale odontoiatrico una valutazione del metabolismo minerale, hanno riferito i dati derivati da analisi ematiche in merito al dosaggio di 25-OHD3, Calcemia, Fosfatemia, Fosfatasi alcalina, Fosfatasi alcalina ossea, Paratormone.
- grading della malattia parodontale: il personale odontoiatrico ha eseguito il sondaggio della profondità delle tasche parodontali, recessione gengivale, tartaro sotto-gengivale, pus e sanguinamento, motilità dentaria, indice di placca. I soggetti sono stati classificati come affetti da parodontite aggressiva o cronica (Amitage CG, 1994).
- profilo microbico parodontale: campioni provenienti dalla placca subgengivale raccolti da ognuno dei soggetti sono stati valutati da biologi specializzati dell'istituto Biomolecular Diagnostic per l'identificazione dei patogeni parodontali più rilevanti (tale procedura è in uso normalmente nello studio dentistico IRF in Microdentistry, Responsabile scientifico Dr. Francesco Saverio Martelli):
 1. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Tannerella forsythensis, Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Peptostreptococcus micros, Filifactor alocis, Synergistetes, Porphyromonas endodontalis (complesso rosso, associati con parodontite severa o avanzata).
 2. Fusobacterium nucleatum spp, Campylobacter rectus e Prevotella intermedia, Leptotrichia hofstadii, Rothia dentocariosa (complesso arancione, associati a parodontite media o iniziale).
 3. Eikenella corrodens, Cardiobacterium hominis (complesso verde, associati con uno stato di salute della cavità boccale).

4. Epstein Barr virus (EBV), Herpes Simplex Virus (HSV), associati con una maggiore frequenza di rilevazione di batteri parodontali.
5. Candida albicans (questo fungo è associato con una maggiore frequenza di riscontro di batteri parodontali).

Per la caratterizzazione dei profili microbici parodontali il materiale genetico è stato estratto dai campioni ed analizzato attraverso procedura di Real Time qPCR con la collaborazione del laboratorio Biomolecular Diagnostic Srl, utilizzando primers specifici e sonde specifiche per il riconoscimento di ogni microrganismo. Questa tecnica si basa sull'analisi dell'RNA ribosomiale codificante la sub-unità minore dei ribosomi (16S), poiché i ribosomi, possedendo la funzione fondamentale di tradurre l'm-RNA in proteine, hanno conservato la loro struttura genetica nell'arco del tempo, al contrario di altre regioni genetiche molto più variabili all'interno delle stesse specie batteriche. L'allineamento e la comparazione di sequenze di r-RNA 16S tra differenti microorganismi consente la costruzione di alberi filogenetici.

- polimorfismi genetici dei marker infiammatori associati alla malattia parodontale e relativi al metabolismo osseo: sugli stessi campioni ottenuti in sede di visita odontoiatrica, il personale del Biomolecular diagnostic ha eseguito una analisi sul livello di espressione delle citochine pro-infiammatorie IL-1, IL-10, TNF- α ; polimorfismi del recettore per il calcio VDR (TaqI, ApaI, BsmI, FokI), e del collagene di tipo I (COL1A1).

Lo studio dei polimorfismi è fondamentale per determinare la suscettibilità a diverse patologie in modo da determinare dei profili di rischio individuali finalizzati al trattamento personalizzato ed alla prevenzione precoce di queste malattie. La valutazione dei polimorfismi dei mediatori dell'infiammazione, in particolare IL-1, IL-10 e TNF- α è fondamentale per il monitoraggio dello sviluppo della patologia parodontale; infatti, concentrazioni elevate di questi mediatori in soggetti affetti da parodontite correlano strettamente con una distruzione tissutale e con una accentuata risposta immunitaria. Lo studio dei polimorfismi del recettore della vitamina D (VDR) diviene uno strumento utile al clinico per identificare gli individui suscettibili a sviluppare osteoporosi, assieme al polimorfismo relativo alla produzione del collagene di tipo I, fortemente associato con valori di massa ossea ridotti e con la presenza di fratture osteoporotiche in diverse popolazioni caucasiche. Il DNA, prelevato tramite tamponi buccali, verrà estratto e successivamente analizzato tramite PCR qualitativa.

- attività enzimatica della metalloproteinasi-8 (MMP-8): Gli stessi campioni biologici inviati per l'analisi microbiologica e genetica sono stati dosati in merito all'attività enzimatica della MMP-8. Le metalloproteasi della matrice (MMP) sono una famiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti, prodotte da numerosi tipi cellulari inclusi fibroblasti, cellule endoteliali, osteoblasti, macrofagi, linfociti e neutrofili, ed in grado di degradare diversi componenti della matrice extracellulare (ECM), ma anche citochine, recettori e fattori che regolano la motilità cellulare. Un complesso sistema di regolazione assicura il mantenimento dell'equilibrio tra espressione ed inibizione delle MMP garantendo il corretto rimodellamento della matrice extracellulare essenziale nei processi di morfogenesi tissutale, riparazione ed apoptosi. Il collagene rappresenta uno dei componenti

principali del tessuto connettivo e della matrice extracellulare del parodonto. Il processo di degradazione del collagene avviene principalmente ad opera delle MMP. MMP-8 viene prodotta anche dalle cellule endoteliali, dalle cellule muscolari lisce, dai macrofagi e da tessuti più specializzati quali ad esempio gli odontoblasti, i fibroblasti gengivali, le cellule del ligamento parodontale e del solco gengivale. La presenza a livello del cavo orale della aMMP-8, correla con la progressione e con la severità dei parametri clinici parodontali: presenza di sanguinamento gengivale, perdita di attacco e maggiore profondità delle tasche. L'attivazione della MMP-8 precede il danno tissutale e la sua rilevazione nel fluido crevicolare o in quello sulcolare perimplantare rappresenta un importante biomarker per la diagnosi precoce di malattia parodontale e perimplantare, oltre che un chiaro indicatore dell'efficacia terapeutica.

Piano statistico

L'analisi statistica è stata effettuata tramite il software SPSS e Microsoft Excel. I dati quantitativi derivati dall'analisi dei parametri relativi all'osteoporosi, alla malattia parodontale e alle abitudini alimentari (t-score, concentrazioni batteriche, frequenze di consumo alimentari ecc.) sono stati descritti attraverso l'uso di indici statistici di tendenza centrale (media) e di variabilità (minimo, massimo, intervallo, deviazione standard). Per i dati qualitativi, sono state presentate le statistiche descrittive più idonee (distribuzioni di frequenza, frequenze relative ecc.).

Dopo aver classificato i pazienti sulla base di presenza o assenza di osteoporosi/osteopenia, i gruppi sono stati confrontati in relazione a una serie di variabili quantitative (concentrazioni batteriche, attività enzimatica della metalloproteinasi, assunzione giornaliera di calcio ecc.) tramite i test statistici più idonei per campioni indipendenti (o un test non parametrico equivalente nel caso di distribuzioni non normali). Inoltre, l'associazione tra osteoporosi/osteopenia e variabili qualitative (presenza di parodontite, abitudini al fumo, abitudini alimentari, espressione di polimorfismi genetici) è stata valutata.

Dopo aver classificato i pazienti in funzione della gravità della malattia parodontale (lieve, moderata, severa), i gruppi sono stati confrontati in relazione a una serie di variabili quantitative (t-score, parametri ematici del metabolismo osseo) tramite ANOVA e conseguenti post-hoc corretti con il metodo di Bonferroni (o un test non parametrico equivalente nel caso di distribuzioni non normali). Inoltre, l'associazione tra gravità della malattia parodontale e variabili qualitative (presenza di osteoporosi/osteopenia, abitudini al fumo, abitudini alimentari, espressione di polimorfismi genetici ecc.) è stata valutata.

Risultati

Statistiche descrittive della popolazione in studio

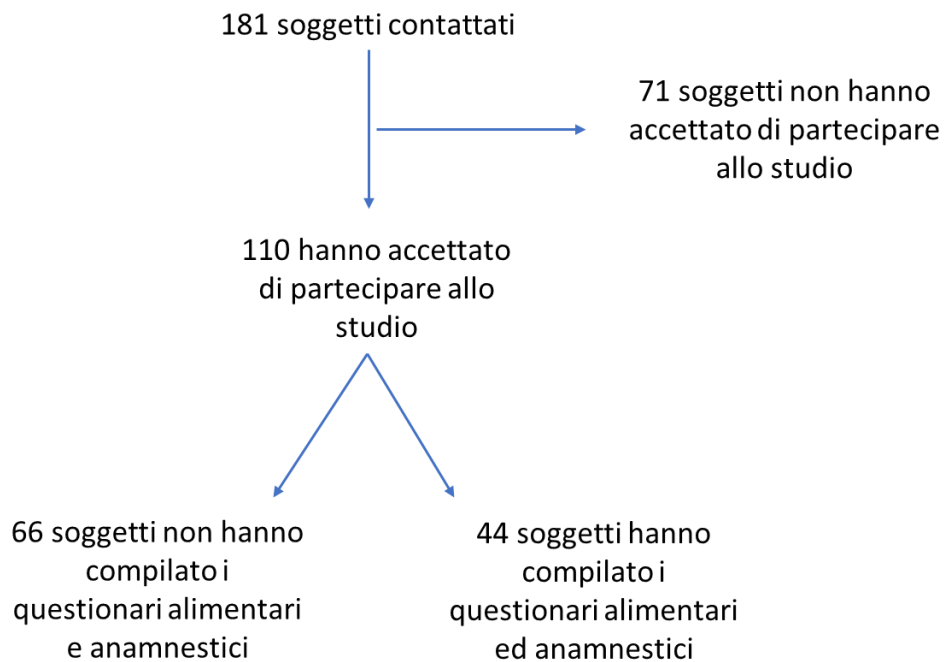
Nel corso dei tre anni di progetto, sono stati contattati per la partecipazione allo studio 181 soggetti. Di questi, 110 hanno accettato di prendere parte all'indagine, gli altri hanno rifiutato di partecipare perché non interessanti.

Dei 110 soggetti, tutti hanno riportato dati inerenti alla loro condizione mineralometrica e metabolica a livello osseo, dati relativi alle analisi genetiche richieste e alle caratteristiche microbiologiche parodontali.

Solamente a 44 persone è stato possibile somministrare i questionari anamnestici e sulle abitudini alimentari; questo perché purtroppo la situazione pandemica che ci troviamo a vivere in questi anni ha impedito il contatto diretto con i soggetti, che quindi sono stati contattati telefonicamente per rispondere alle domande richieste. Molti soggetti al momento del contatto telefonico sono risultati irrintracciabili o non più interessati a partecipare al progetto.

Di seguito vengono riportati i dati descrittivi raccolti.

Nel complesso, abbiamo ottenuto i dati di 110 soggetti, 36 maschi e 74 femmine.



Età media ed antropometria

L'età media del campione totale è risultata essere di 55 anni, mentre per quanto riguarda le caratteristiche antropometriche, il peso medio è risultato essere di 67 Kg, l'altezza media 1,68 m e BMI di 23,65, quindi normopeso (tab. 1).

	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.	Asimmetria
	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
Età	110	27	101	55,22	13,208	,478
Peso (Kg)	107	41,0	120,0	67,250	15,0090	,835
Altezza (m)	107	1,53	1,89	1,6832	,08513	,271
BMI	107	15,6226	41,9143	23,652578	4,6736212	1,449

Tabella 1: età media e antropometria

Distinguendo per genere, gli uomini hanno riportato valori tendenzialmente più alti a livello antropometrico (tab. 2, 3).

Maschi	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.	Asimmetria
	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
Età	36	27	81	56,83	12,707	-,442
Peso (Kg)	36	55,0	120,0	78,236	12,8755	,998
Altezza (m)	36	1,55	1,89	1,7650	,06670	-,837
BMI	36	19,7210	41,6233	25,136001	4,2250091	1,953

Tabella 2: età media e antropometria nei maschi

Femmine	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.	Asimmetria
	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
Età	74	29	101	54,43	13,459	,875
Peso (Kg)	71	41,0	110,0	61,679	12,8328	1,317
Altezza (m)	71	1,53	1,78	1,6417	,05967	,259
BMI	71	15,6226	41,9143	22,900419	4,7376427	1,547

Tabella 3: età media e antropometria nelle femmine

Questionario anamnestico

Stile di vita e anamnesi preliminari

Di seguito riportiamo i risultati descrittivi nel sottogruppo di popolazione che ha risposto alle domande del questionario anamnestico.

Il 64,9% della popolazione ha dichiarato di non avere predisposizione familiare per la malattia osteoporotica; tutti quanti hanno segnalato di essere nati da parto naturale, e soltanto due soggetti con parto prematuro.

Solamente il 25,3% della popolazione ha dichiarato di essere fumatore e la quasi totalità del campione (97,3%) segue un regime alimentare “onnivoro”.

Più del 75% del campione ha dichiarato di non consumare bevande alcoliche.

Infine, più dell’80% del campione ha dichiarato di avere un’attività intestinale regolare e solamente il 19% ha segnalato di soffrire di stipsi ricorrente (tab.4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

Familiarità per osteoporosis?	Frequenza	Percentuale valida
si	13	35,1
no	24	64,9
Totale	37	100,0

Tabella 4: Familiarità per osteoporosi

Tipo di parto?	Frequenza	Percentuale valida
Parto naturale	35	100,0

Tabella 5: Tipo di parto (1)

Parto prematuro?	Frequenza	Percentuale valida
si	2	5,9
no	32	94,1
Totale	34	100,0

Tabella 6: tipo di parto (2)

Fuma?	Frequenza	Percentuale valida
si	24	25,3
no	71	74,7
Totale	95	100,0

Tabella 7: abitudine al fumo

Tipo di regime alimentare?	Frequenza	Percentuale valida
onnivoro	36	97,3
vegetariano	1	2,7
Totale	37	100,0

Tabella 8: regime alimentare

Consuma bevande alcoliche?	Frequenza	Percentuale valida
si	9	24,3
no	28	75,7
Totale	37	100,0

Tabella 9: consumo di alcol

Attività alvo?	Frequenza	Percentuale valida
regolare	30	81,1
stipsi	7	18,9
Totale	37	100,0

Tabella 10: attività dell'alvo

Età menarca e Menopausa

Il 52% delle donne intervistate ha dichiarato di essere in menopausa. L'età media per la menopausa è risultata essere di 49 anni, mentre l'età del menarca di 13 anni. Nessuna donna era in stato di gravidanza al momento del questionario. Infine, solamente una persona ha dichiarato di essere in terapia ormonale sostitutiva (tab. 11, 12, 13).

Menopausa?	Frequenza	Percentuale valida
si	26	52,0
no	24	48,0
Totale	50	100,0

Tabella 11: menopausa

	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.	Asimmetria
	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
Età menarca (anni)	23	11,0	17,0	13,239	1,5658	,494
Età menopausa	12	35	55	49,17	5,828	-1,484
Gravidanze precedenti	23	0	3	,96	,976	,414
Validi (listwise)	12					

Tabella 12: menarca, menopausa e gravidanze precedenti

Terapia ormonale sostitutiva?	Frequenza	Percentuale valida
si	1	4,3
no	22	95,7
Totale	23	100,0

Tabella 13: Terapia ormonale sostitutiva

Anamnesi patologica

E' stata condotta un'indagine sulle comorbidità presenti nella popolazione che ha risposto ai questionari anamnestici. Di seguito vengono riportati i dati maggiormente significativi:

- il 91,7% del campione ha dichiarato di godere di uno stato di buona salute;
- il 27% soffre di disturbi del sonno;
- l'8,1% soffre di astenia;
- il 13,5% soffre di dolori muscolo/scheletrici diffusi;
- il 10,8% soffre di intolleranza al lattosio;
- il 10,8% segnala una allergia al nickel;
- il 2,7% soffre di malattia celiaca;
- il 2,7% presenta intolleranza al glutine;
- il 18,9% dichiara di aver subito fratture pregresse;
- il 2,7% soffre di calcolosi biliare;
- il 2,7% segnala malattie reumatiche;
- il 2,7% dichiara di soffrire di osteoporosi conclamata;
- il 18,9% dichiara di soffrire di malattie della tiroide;
- il 2,7% soffre di iperparatiroidismo;
- l'8,1% soffre di malattie dell'apparato digerente;
- il 2,7% soffre del morbo di Cushing;
- il 2,7% presenta malattie cardiache;
- l'8,1% ha segnalato la presenza di malattie del sangue;
- il 16,2% dichiara di soffrire di ipertensione;
- nessun soggetto ha dichiarato di soffrire di allergie alimentari, fibromialgia, malattie renali, diabete, tumori, ipogonadismo, mieloma multiplo, linfomi, epatopatie, malattie emorragiche, malattie polmonari, malattie del sistema nervoso, TBC.

Anamnesi farmacologica

Alle persone intervistate è stato inoltre chiesto se assumevano farmaci o integratori:

- il 2,8% del campione assume farmaci per l'osteoporosi;
- l'11,1% ha dichiarato di aver assunto cortisone per un periodo più lungo di tre mesi;
- il 22,2% segnala l'assunzione di pre o probiotici;
- l'8,1% assume farmaci anticoagulanti;
- il 5,4% segnala l'assunzione di farmaci inibitori di pompa.

Questionario alimentare

Consumo dei principali alimenti importanti per la salute delle ossa e dei denti

Sempre al sottogruppo delle persone intervistate telefonicamente, è stato sottoposto un questionario sulle abitudini alimentari per la stima dell'assunzione di Calcio (Montomoli et al.) e di altri nutrienti importanti per la salute delle ossa e dei denti:

- il 38,6% del campione consuma latte vaccino;
- il 47,7% consuma yogurt;
- il 65,9% consuma formaggi a pasta dura;
- il 32,6% consuma formaggi a pasta semi-dura;
- il 77,3% consuma formaggi a pasta molle;
- il 20,5% consuma ricotta;
- il 95,5% consuma pasta/riso;
- l'81,8% consuma pane;
- il 54,5% consuma patate;
- il 93,2% consuma carne/pesce;
- l'84,1% consuma uova;
- il 77,3% consuma legumi;
- il 95,5% consuma verdure;
- l'84,1% consuma frutta fresca;
- il 29,5% consuma gelato;
- il 14,3% consuma cioccolato al latte;
- il 18,2% assume acqua ricca in calcio.

Nelle tabelle 14 e 15 sono mostrate le frequenze di assunzione medie settimanali e le porzioni medie dei diversi alimenti presi in considerazione.

Nei soggetti che ne hanno dichiarato l'assunzione, il latte viene consumato quasi tutti i giorni, mentre lo yogurt presenta un consumo più saltuario; i formaggi vengono assunti in media 2-3 volte a settimana.

Pasta e pane hanno un consumo medio di 3-4 volte a settimana.

Carne e pesce vengono assunti in media 4 volte a settimana.

I legumi vengono consumati in media 2 volte a settimana e le verdure almeno una volta al giorno.

Alimenti	N	Media (volte/sett)	Deviazione st.
Latte bovino	17	5,94	1,56
Yogurt	21	3,86	2,032
Formaggi a pasta dura	29	3,1	1,934
Formaggi a pasta semi-dura	14	1,93	1,141
Formaggi a pasta molle	34	1,82	1,029
Ricotta	9	1,89	1,054
Pasta/riso	42	4,31	2,054
Pane	36	5,33	2,138
Patate	24	1,71	0,751
Carne/pesce	41	4,2	1,860
Uova	37	2,68	1,547
Legumi	34	2,41	1,598
Verdure	42	9,29	4,397
Gelato	13	2,08	1,038
Cioccolato al latte	6	1,83	1,329

Tabella 14: frequenza di consumo dei diversi gruppi alimentari

Alimenti	N	Media (g)	Deviazione st.
Latte bovino	17	207,35	59,794
Yogurt	21	129,05	37,504
Formaggi a pasta dura	29	64,66	35,955
Formaggi a pasta semi-dura	14	62,86	30,237
Formaggi a pasta molle	34	91,47	34,455
Ricotta	9	102,78	8,333
Pasta/riso	42	90,95	25,644
Pane	36	95,28	32,38
Patate	24	250	106,322
Carne/pesce	41	135,37	30,091
Uova	37	133,78	77,329
Legumi	34	121,47	47,106
Verdure	42	176,9	68,876
Gelato	13	84,62	37,553
Cioccolato al latte	6	41,67	30,277

Tabella 15: porzioni medie assunte dei diversi gruppi alimentari

Per il consumo di frutta, la domanda chiedeva quanti frutti a settimana venissero consumati; 37 soggetti su 44 hanno risposto di consumare almeno un frutto a settimana, i restanti hanno dichiarato di non consumare frutta. Il consumo medio di frutta fresca nella popolazione è risultato essere di 11,89 frutti a settimana (deviazione standard $\pm 1479,56$), ovvero 1,69 frutti/die.

Assunzione giornaliera dei principali nutrienti utili per la salute delle ossa e dei denti

In tabella 16 sono riportati i valori di assunzione giornalieri dei principali nutrienti analizzati, importanti per la prevenzione della salute ossea e dentale.

Rispetto all'età media della popolazione (55 anni), dai dati in nostro possesso possiamo evidenziare che l'assunzione di alcuni nutrienti nella popolazione in oggetto risulta essere al di sotto dei valori raccomandati dai Livelli di assunzione di riferimento di nutrienti ed energia (L.A.R.N.) (SINU, 2014), in particolare:

- calcio;
- ferro;
- magnesio;
- potassio;
- selenio;
- zinco;
- vit D;
- vit B12;
- fibra alimentare

risultano insufficienti rispetto agli apporti giornalieri raccomandati.

	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
Ca/die mg	44	218,9843	1507,5456	760,717584	321,6166047
P/die mg	44	385,6909	1482,6531	931,571488	237,3435570
Na/die mg	44	439,9885	1921,2101	973,602366	346,1657990
Fe/die mg	44	2,0775	12,7557	7,893709	2,5206753
Mg/die mg	44	60,8884	254,7129	171,823180	53,2108933
K/die mg	44	550,0149	3386,0009	2105,757209	667,6191528
Se/die mcg	44	11,4049	43,4157	27,981607	8,0220100
Zn/die mg	44	3,6157	14,5086	8,410503	2,2191760
VitC mg	44	4,8416	230,3100	132,337146	60,4172013
VitD mcg	44	,4771	3,1066	1,710894	,7033637
VitB12 mcg	44	1,1937	7,2377	3,843221	1,4569935
Fibra g	44	1,6243	29,0643	15,853422	6,3186625
Carboidrati/die g	44	27,3375	242,0902	117,304227	49,3132783
Proteine/die g	44	22,3883	81,7782	52,279235	12,8332595
Lipidi/die g	44	10,8759	52,1176	28,606461	9,3295696

Tabella 16: assunzioni medie dei nutrienti analizzati

Marker turnover osseo e mineralometria ossea

Sull'intero campione di soggetti sono stati raccolti i dati mineralometrici, ottenuti tramite mineralometria ossea computerizzata (MOC) o ultrasonografia al calcagno (QUS). Ove disponibili, sono stati raccolti anche i dati relativi ai dosaggi ematici di 25OHD3, PTH, calcemia, fosfatemia, fosfatasi alcalina e fosfatasi alcalina ossea (tab. 17, 18).

Marker turnover osseo	N	Media	Deviazione std.
	Statistica	Statistica	Statistica
25OHD3 (ng/mL)	81	27,3035	8,97985
PTH (pg/mL)	80	37,3475	19,28684
Calcemia (mg/dL)	34	9,1532	2,52885
Fosfatemia (mg/dL)	30	3,5627	,71254
Fosfatasi alcalina (U/L)	16	68,31	14,202
Fosfatasi alcalina ossea (ug/L)	10	13,000	5,2993

Tabella 17: livelli medi dei marker di turnover osseo analizzati

Dati mineralometrici	N	Media	Deviazione std.
	Statistica	Statistica	Statistica
Tscore lumbar	15	-2,093	1,5917
Tscore femore tot	13	-1,823	,9671
Tscore femore collo	14	-2,157	,9788
Tscore piede dx	99	-,961	1,2538
Tscore piede sx	99	-,948	1,2966

Tabella 18: dati mineralometrici

In media, il valore rilevato per 25OHD3 risulta insufficiente rispetto ai valori di riferimento.

I valori di PTH, calcemia, fosfatemia, fosfatasi alcalina e fosfatasi alcalina ossea risultano invece nella media rispetto ai valori di riferimento.

I t-score rilevati in sede lombare e femorale attraverso esame MOC, risultano in media al di sotto dei valori desiderabili, mentre i valori rilevati attraverso ultrasonografia al calcagno risultano in media in un range ottimale, seppur al limite.

Il 35,5% del campione ha presentato valori mineralometrici nella norma, il 48,2% valori tendenti all'osteopenia e il 16,4% valori che testimoniano una condizione di osteoporosi (tab. 19).

Esito esame	Frequenza	Percentuale valida
normale	39	35,5
osteopenia	53	48,2
osteoporosi	18	16,4
Totale	110	100,0

Tabella 19: esito esame mineralometrico

Grading della malattia parodontale

Classificazione, profondità di tasca (PPD), recessione gengivale (REC), Indice di Placca

La classificazione della gravità della malattia parodontale è stata ottenuta utilizzando la classificazione proposta da Amitage GC (1999).

Dall'analisi risulta che i pazienti presentano sempre forme di parodontite generalizzate, in cui prevalgono le forme croniche rispetto alle forme giovanili/aggressive; in particolare il 16,4 % presenta una forma cronica lieve, il 41,8% una forma moderata e il 32,7% una forma di grado severo (tab. 20).

Parodontite (Amitage CG 1999)	Frequenza	Percentuale valida
Cronica, lieve, generalizzata	18	16,4
Cronica, moderata, generalizzata	46	41,8
Cronica, severa, generalizzata	36	32,7
Aggressiva, lieve, generalizzata	1	,9
Aggressiva, moderata, generalizzata	1	,9
Aggressiva, severa, generalizzata	8	7,3
Totale	110	100,0

Tabella 20: tipi di parodontite riscontrati nella popolazione

La profondità di tasca (PPD) media rilevata al sondaggio è risultata 5,54 mm, quindi oltre i valori considerati fisiologici, mentre la recessione gengivale media è stata di 0,59 mm. L'indice di placca medio è risultato essere del 31,16% (tab. 21).

	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
PPD media (mm)	110	2,20	15,00	5,5414	1,42438
REC media (mm)	110	,00	2,40	,5877	,59648
Indice di placca (%)	97	0	90,48	31,1609	25,10672

Tabella 21: PPD, REC e indice di placca medi nella popolazione

Dosaggio della metalloproteinasi-8 (MMP-8)

Il dosaggio dell'MMP-8 a livello dei campioni salivari raccolti ha evidenziato un severo stato infiammatorio diffuso (98,1% dei soggetti), in linea con uno stato tendenzialmente avanzato della patologia parodontale, con un valore medio di 111,86 ug/mL (tab. 22, 23). 6 soggetti su 110 non hanno eseguito l'esame e quindi sono mancanti di quest'analisi.

MMP-8	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
MMP-8 (ng/mL)	104	1	180	111,86	60,748
Validi	104				

Tabella 22: dosaggio di MMP-8 medio nella popolazione

Status infiammatorio	Frequenza	Percentuale valida
Assenza di infiammazione	2	1,9
Severa infiammazione	102	98,1
Totale	104	100,0
Mancanti	6	
Totale	110	

Tabella 23: infiammazione relativa al dosaggio di MMP-8 nella popolazione

Analisi microbiologiche

Analisi sulle specie appartenenti ai complessi di Socransky

Il dosaggio delle concentrazioni microbiche delle specie appartenenti ai complessi rosso, arancione e verde secondo la classificazione di Socransky mostra delle concentrazioni tendenzialmente al di sopra dei valori fisiologici (superiori a 10^3 copie/uL) per tutti i tipi di microorganismo, ove rilevati. (grafico 1, tab. 24, 25).

La rilevazione dei diversi microrganismi si ottiene al di sopra di una concentrazione di 10^2 copie/uL, (valore minimo soglia per il metodo di rilevazione utilizzato, ovvero la Real time PCR).

I microrganismi che hanno mostrato una percentuale di soggetti con valori non fisiologici, cioè maggiore rispetto a 10^3 copie/uL, risultano essere:

- P. gingivalis (complesso rosso), 68,2%;
- P. endodontalis (complesso rosso), 78%;
- T. forsythensis (complesso rosso), 74,5%;
- P. micros (complesso rosso), 62,7%;
- F. alocis (complesso rosso), 59,6%;
- Synergistetes (complesso rosso), 83,5%;
- F. nucleatum (complesso arancione), 81,8%;
- C. rectus (complesso arancione), 56,4%;
- E. corrodens (complesso verde), 53,6%;
- C. hominis (complesso verde), 72,5%.

	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
Carica batterica totale	110	80000	200000000	11568978,18	25992242,871
(copie/μl) A. actinomycetemcomitans	110	0	2300000	22842,77	219295,046
(copie/μl) P. gingivalis	110	0	55500000	1094530,42	5576959,645
(copie/μl) P. endodontalis	109	0	23400000	699523,29	2686757,504
(copie/μl) T. forsythensis	110	0	35200000,0	1221587,318	4767461,6500
(copie/μl) T. denticola	110	0	759000	36960,53	118372,970
(copie/μl) P. micros	110	0	1160000	44375,78	168354,163
(copie/μl) F. alocis	109	0	1140000	46624,16	169666,354
(copie/μl) Synergistetes	109	0	5280000	546933,16	1017021,850
(copie/μl) P. intermedia	110	0	1140000	40878,37	160754,154
(copie/μl) F. nucleatum	110	0	25800000	356869,09	2473601,143
(copie/μl) C. rectus	109	0	2550000	52376,53	273987,392
(copie/μl) R. dentocariosa	109	0	201000,0	6914,349	26050,8026
(copie/μl) L. hofstadii	109	0	72000	1242,63	7018,584
(copie/μl) E. corrodens	110	0	3840000,0	62757,527	380029,8547
(copie/μl) C. hominis	109	0	30000000,0	345441,239	2874905,8636
Validi (listwise)	108				

Tabella 24: concentrazioni microbiche medie nella popolazione

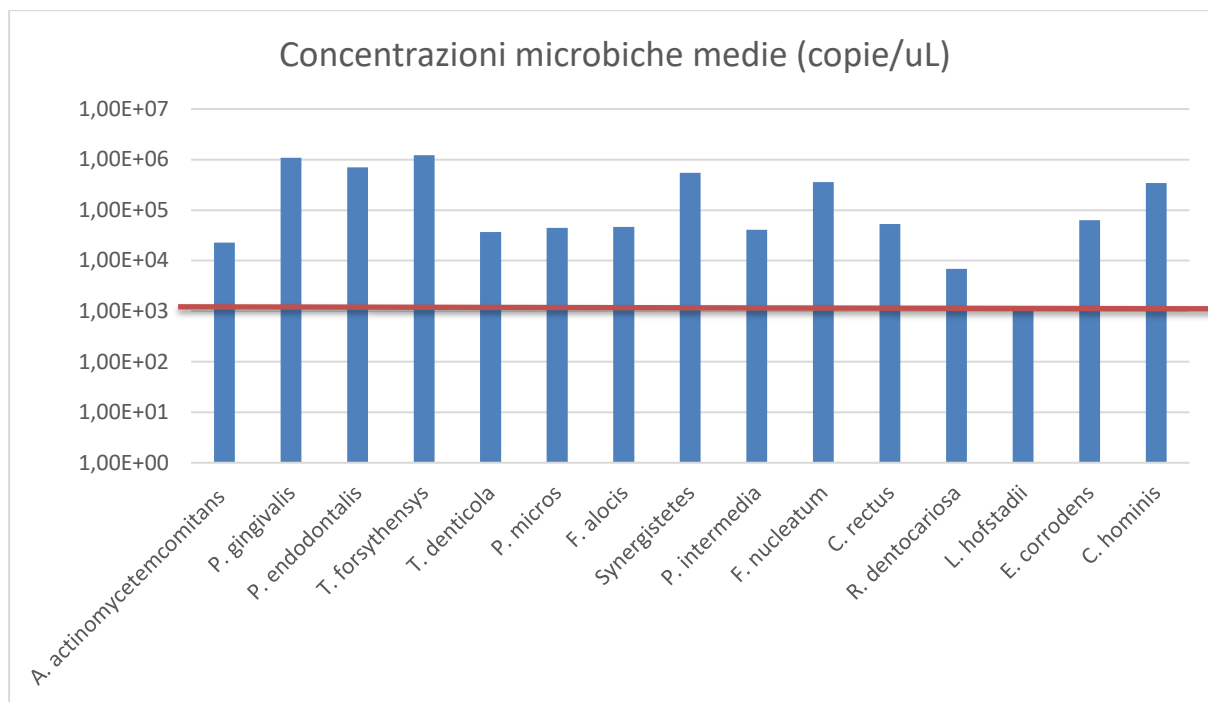


Grafico 1: livelli di concentrazione medi dei microrganismi patogeni rilevati nella popolazione

Microrganismo	N	% di soggetti con concentrazioni fisiologiche	% di soggetti con concentrazioni patologiche
A. actinomycetemcomitans	110	93,6	6,4
P. gingivalis	110	31,8	68,2
P. endodontalis	109	22	78
T. forsythensis	110	25,5	74,5
T. denticola	110	58,2	41,8
P. micros	110	37,3	62,7
F. alocis	109	40,4	59,6
Synergistetes	109	16,5	83,5
P. intermedia	110	62,7	37,3
F. nucleatum	110	18,2	81,8
C. rectus	110	43,6	56,4
R. dentocariosa	110	57,8	42,2
L. hofstadii	110	85,3	14,7
E. corrodens	110	46,4	53,6
C. hominis	109	27,5	72,5

Tabella 25: percentuali di soggetti con concentrazioni patologiche o fisiologiche per ogni microrganismo analizzato

Analisi sulle specie virali e fungine

E' stata inoltre ricercata nella popolazione la presenza di altri microrganismi, virali o fungini, che possono aggravare lo stato della malattia parodontale; in particolare è stata saggiata la presenza di Epstein-Barr virus, Herpes simplex virus e C. Albicans.

Epstein-Barr è stato riscontrato nel 5,5% del campione analizzato; Herpes simplex virus è stato ritrovato nell'1,8% dei soggetti e C. albicans nel 3,6% (tab. 26).

Microrganismo	N	% popolazione rilevato	% popolazione non rilevato
Epstein-barr virus	110	5,5	94,5
Erpes simplex virus	110	1,8	98,2
C. albicans	110	3,6	96,4

Tabella 26: specie virali e fungine rilevate nella popolazione

Analisi genetiche

Polimorfismi dei geni codificanti IL-1 e IL-10

Dall'analisi genetica dei polimorfismi dei geni codificanti la produzione di IL-1 e IL-10, marker dell'infiammazione, si osserva che più del 50% del campione presenta una alterazione di grado moderato o severa nell'espressione del gene codificante la produzione di IL-1 (grafico 2).

Per quanto riguarda IL-10 invece, solamente il 15% del campione ha mostrato una espressione di polimorfismi che predispongono ad un'elevata produzione della citochina pro-infiammatoria (GCC/GCC) (grafico 3).

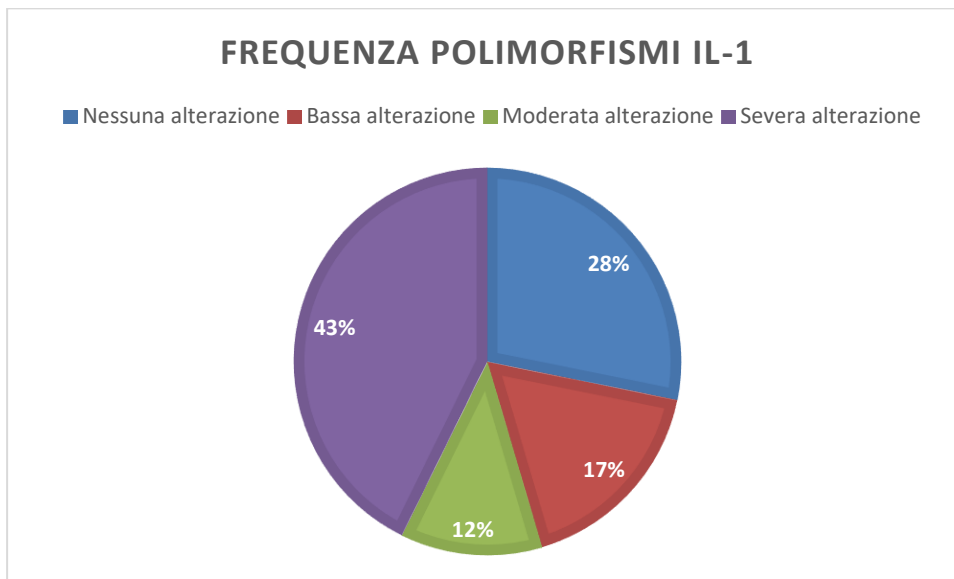


Grafico 2: frequenza dei polimorfismi di IL-1

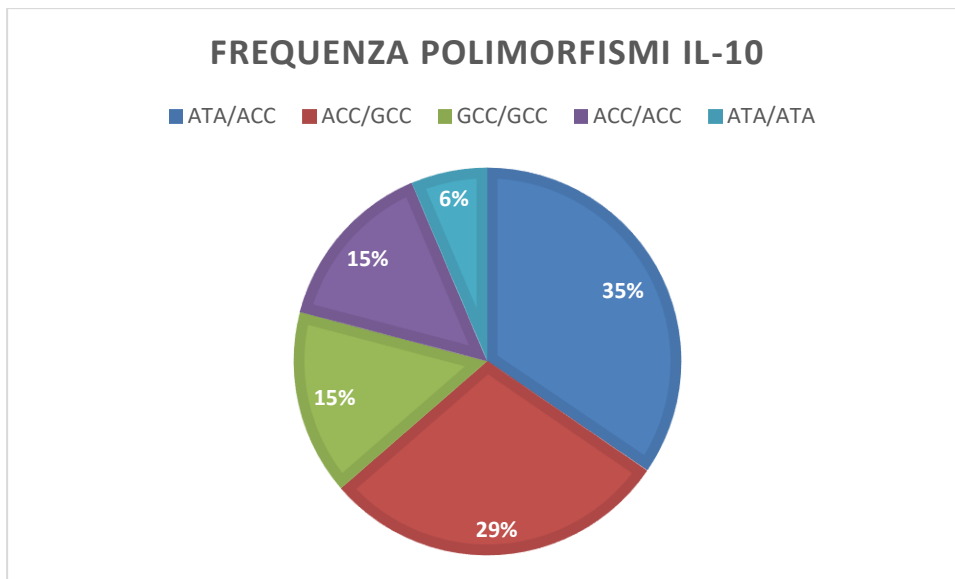


Grafico 3: frequenza dei polimorfismi di IL-10

Polimorfismi del gene codificante TNF- α

Riguardo l'espressione dei polimorfismi del gene codificante la produzione del TNF- α , il 72% del campione ha mostrato l'espressione di polimorfismi non predisponenti ad un maggior livello di infiammazione (GG) (grafico 4) (Singh P., 2014).

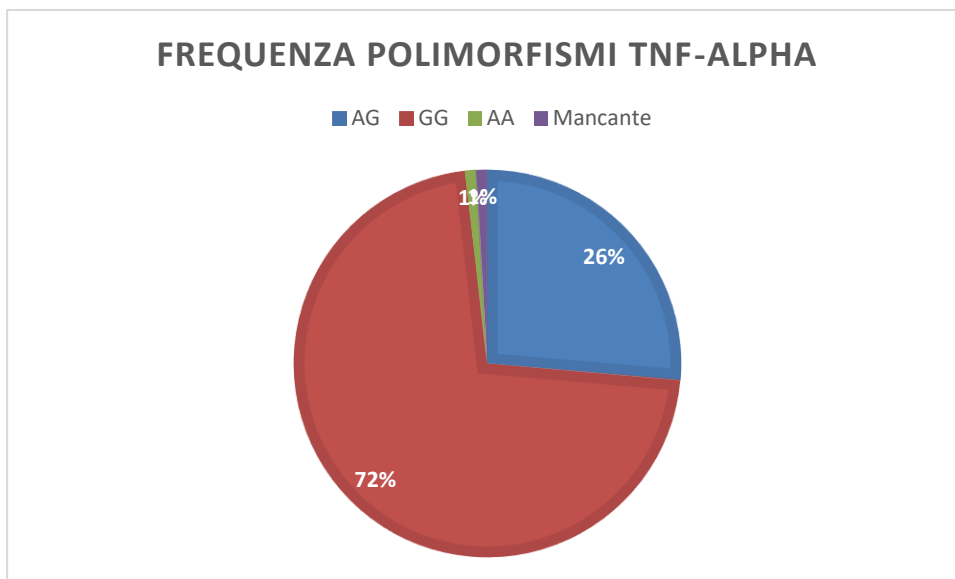


Grafico 4: frequenza dei polimorfismi di TNF-alpha

Polimorfismi del gene codificante il recettore della vitamina D (VDR)

Sono stati esaminati i polimorfismi TaqI, ApaI, BsmI, FokI nella loro espressione ed è risultato che:

- Per TaqI, il 59% dei soggetti analizzati ha rivelato l'espressione di polimorfismi che predispongono ad una maggiore suscettibilità di sviluppare la malattia parodontale, tuttavia non correlabile con ridotti livelli sierici di vitamina D (Tt); il 27% ha invece espresso polimorfismi che predispongono ad una maggiore suscettibilità di sviluppare la malattia parodontale, sia a

ridotti livelli sierici di vitamina D (TT); il restante 14% ha invece espresso polimorfismi non associabile a le condizioni sopra citate (tt) (grafico 5).

- Per ApaI, complessivamente l'81% del campione ha mostrato l'espressione di polimorfismi che possono predisporre all'insorgenza della malattia osteoporotica (AA, Aa), mentre solo il 18% ha espresso polimorfismi non predisponenti (aa) (grafico 6).
- Per BsmI, il 73% dei soggetti ha mostrato di esprimere polimorfismi che possono predisporre alla diminuzione dei valori della densità minerale ossea e ad un ridotto assorbimento di calcio intestinale (BB, Bb); il restante 26% ha mostrato invece l'espressione di polimorfismi non predisponenti un maggiore rischio (bb) (grafico 7).
- Per FokI, il 91% dei soggetti ha espresso polimorfismi genici che possono predisporre ad una diminuzione della densità minerale ossea (FF, Ff); l'8% del campione non ha mostrato tale predisposizione (ff) (grafico 8) (Tobon-Arroyave SI., 2017) .

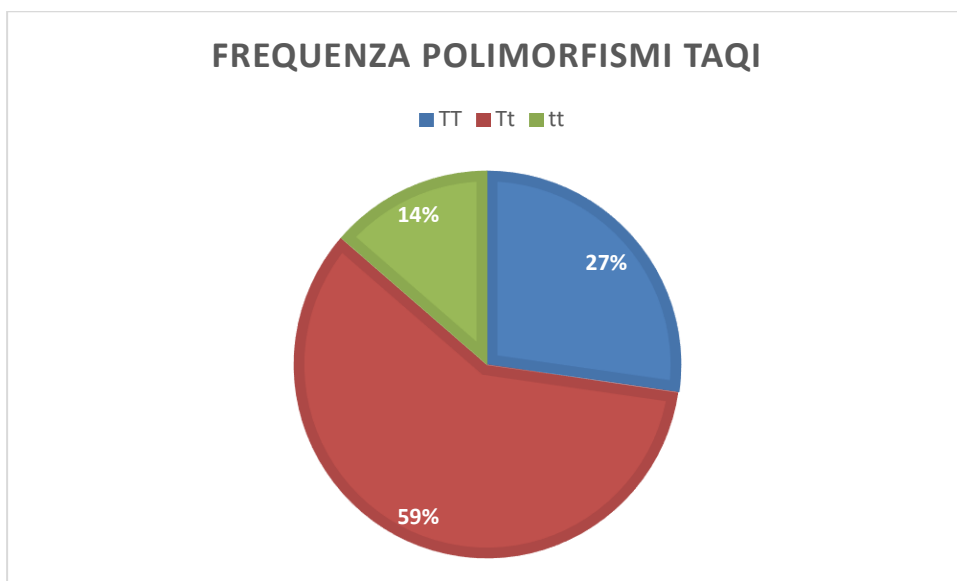


Grafico 5: frequenza dei polimorfismi di VRD TaqI nella popolazione

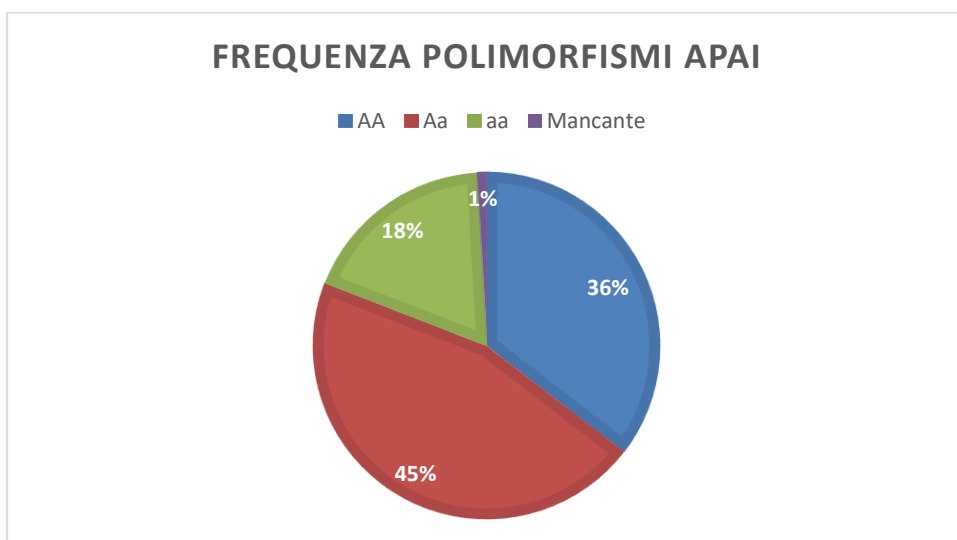


Grafico 6: frequenza dei polimorfismi di VDR ApaI nella popolazione

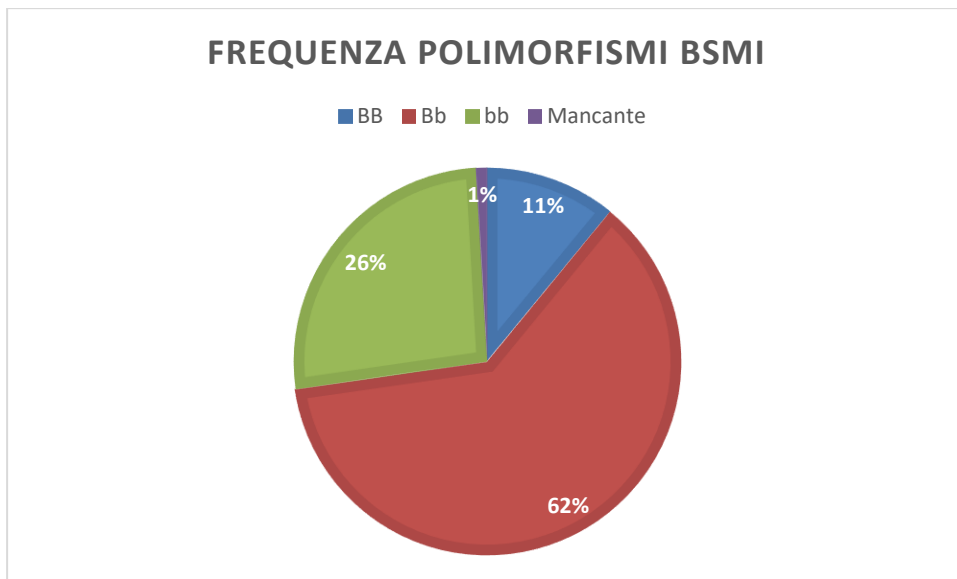


Grafico 7: frequenza dei polimorfismi di VDR BsmI nella popolazione

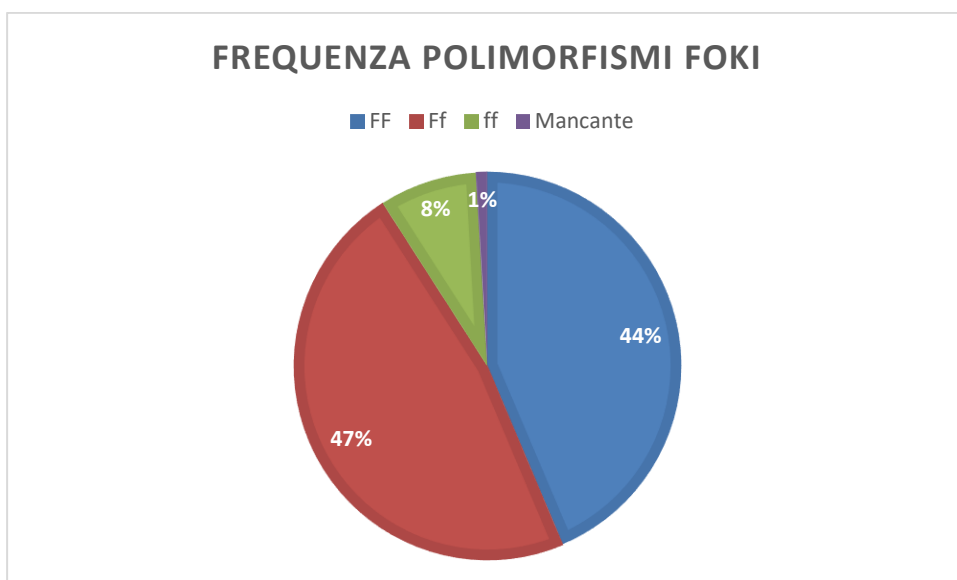


Grafico 8: frequenza dei polimorfismi di VDR FokI nella popolazione

Polimorfismi codificanti la produzione del collagene di tipo 1 (COL1A1)

Dall'analisi dell'espressione dei polimorfismi del collagene di tipo 1 (grafico 6), si è osservata una maggiore frequenza nel campione di polimorfismi che non sembrano essere associati ad una maggiore probabilità di rischio di sviluppare la malattia osteoporotica (SS, 61%), rispetto ai polimorfismi ritenuti predisponenti (Ss, ss) (Mann V., 2003).

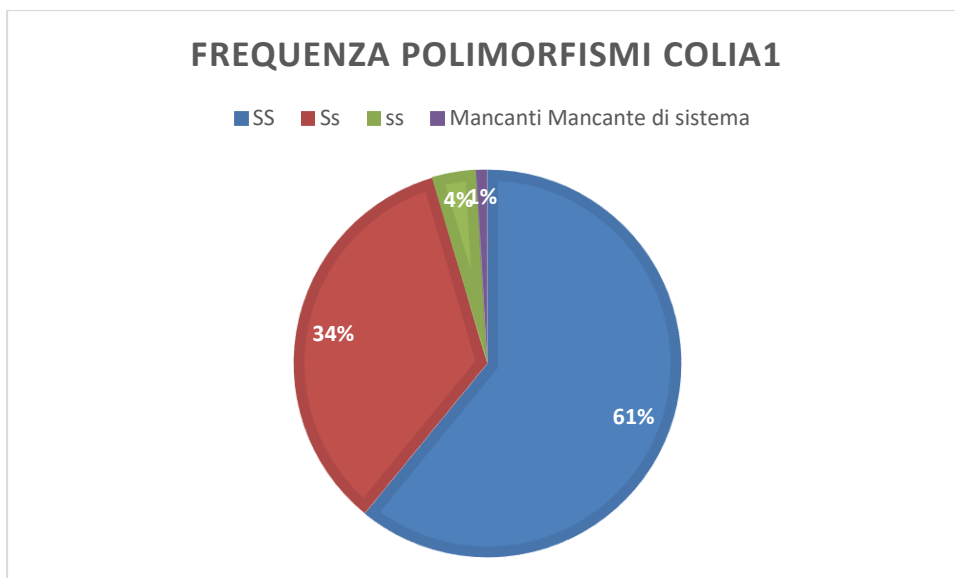


Grafico 9: frequenza dei polimorfismi di COLIA1 nella popolazione

Statistiche inferenziali - Significatività

Studio delle differenze nei consumi alimentari e nell'assunzione di nutrienti tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici e osteoporotici

Effettuando un test ANOVA univariata e relativi test post hoc, si è cercato di indagare se esistono delle differenze significative nell'assunzione di determinati alimenti e nutrienti tra i diversi gruppi di studio, ovvero soggetti con valori di t-score normali, osteopenici ed osteoporotici.

Dalle analisi mostrate in tabella 27, in cui sono mostrate soltanto le analisi effettuate che hanno prodotto risultati significativi, abbiamo ottenuto:

- differenza significativa nella porzione e nella frequenza di consumo di verdure fresche tra soggetti normali ed osteopenici (consumo maggiore);
- differenza significativa nella porzione e nella frequenza del consumo di verdure tra soggetti normali ed osteoporotici (consumo maggiore);
- differenza significativa nella frequenza di assunzione di legumi tra soggetti normali e osteopenici (consumo maggiore);
- differenza significativa nella frequenza di assunzione di legumi tra soggetti normali e osteoporotici (consumo maggiore).

Le altre analisi non hanno dato esiti significativi.

Variabile dipendente	Esito			Esito			Sig.
Frequenza LEGUMI	Normale			Osteopenia			0,032
				Osteoporosi			0,332
	Osteopenia			Normale			0,032
				Osteoporosi			0,998
	Osteoporosi			Normale			0,332
				Osteopenia			0,998

Porzione VERDURE	Normale	Osteopenia	0,01
		Osteoporosi	0,038
	Osteopenia	Normale	0,01
		Osteoporosi	0,852
Frequenza VERDURE	Osteoporosi	Normale	0,038
		Osteopenia	0,852
	Normale	Osteopenia	0,559
		Osteoporosi	0,122
Osteopenia	Normale	0,559	
	Osteoporosi	0,379	
Osteoporosi	Normale	0,122	
	Osteopenia	0,379	

Tabella 27: ANOVA univariata, studio delle differenze nei consumi alimentari tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici e osteoporotici

Per quel che riguarda l'assunzione dei diversi nutrienti nelle tre diverse categorie di soggetti è stato rilevata:

- differenza significativa nell'assunzione di Fe tra soggetti normali ed osteopenici (assunzione maggiore);
- differenza significativa nell'assunzione di Mg tra soggetti normali ed osteopenici assunzione (maggiore);
- differenza significativa nell'assunzione di K tra soggetti normali ed osteopenici (assunzione maggiore);
- differenza significativa nell'assunzione di vit C tra soggetti normali ed osteopenici (assunzione maggiore);
- differenza significativa nell'assunzione di vit C tra soggetti normali ed osteoporotici (assunzione maggiore);
- differenza significativa nell'assunzione di fibre tra soggetti normali ed osteopenici (assunzione maggiore);

I valori di p sono riportati in tabella 28.

Le altre analisi non hanno dato esito significativo.

Variabile dipendente	Esito mineralometria	Esito mineralometria	Errore std.	Sig.
Ca/die_mg	Normale	Osteopenia	103,5798	0,847
		Osteoporosi	161,6607	0,477
	Osteopenia	Normale	103,5798	0,847
		Osteoporosi	162,5093	0,697
Osteoporosi	Normale	161,6607	0,477	
	Osteopenia	162,5093	0,697	
P/die_mg	Normale	Osteopenia	76,30852	0,436

		Osteoporosi	119,0975	0,914
	Osteopenia	Normale	76,30852	0,436
		Osteoporosi	119,7227	0,921
	Osteoporosi	Normale	119,0975	0,914
		Osteopenia	119,7227	0,921
Na/die_mg	Normale	Osteopenia	111,4268	0,472
		Osteoporosi	173,9078	0,824
	Osteopenia	Normale	111,4268	0,472
		Osteoporosi	174,8207	0,986
	Osteoporosi	Normale	173,9078	0,824
		Osteopenia	174,8207	0,986
Fe/die_mg	Normale	Osteopenia	0,717718	0,004
		Osteoporosi	1,120168	0,233
	Osteopenia	Normale	0,717718	0,004
		Osteoporosi	1,126048	0,849
	Osteoporosi	Normale	1,120168	0,233
		Osteopenia	1,126048	0,849
Mg/die_mg	Normale	Osteopenia	15,55401	0,013
		Osteoporosi	24,27571	0,167
	Osteopenia	Normale	15,55401	0,013
		Osteoporosi	24,40314	0,999
	Osteoporosi	Normale	24,27571	0,167
		Osteopenia	24,40314	0,999
K/die_mg	Normale	Osteopenia	197,1462	0,015
	Normale	Osteoporosi	307,6932	0,381
	Osteopenia	Normale	197,1462	0,015
		Osteoporosi	309,3084	0,858
	Osteoporosi	Normale	307,6932	0,381
		Osteopenia	309,3084	0,858
Se/die_mcg	Normale	Osteopenia	2,515653	0,158
		Osteoporosi	3,92627	0,756
	Osteopenia	Normale	2,515653	0,158
		Osteoporosi	3,946881	0,881
	Osteoporosi	Normale	3,92627	0,756
		Osteopenia	3,946881	0,881
Zn/die_mg	Normale	Osteopenia	0,69102	0,178
		Osteoporosi	1,0785	0,333
	Osteopenia	Normale	0,69102	0,178
		Osteoporosi	1,084161	0,96
	Osteoporosi	Normale	1,0785	0,333
		Osteopenia	1,084161	0,96

VitC_mg	Normale	Osteopenia	17,35689	0,013
		Osteoporosi	27,08952	0,046
	Osteopenia	Normale	17,35689	0,013
		Osteoporosi	27,23173	0,844
Osteoporosi	Normale	27,08952	0,046	
	Osteopenia	27,23173	0,844	
VitD_mcg	Normale	Osteopenia	0,225023	0,5
		Osteoporosi	0,351201	0,912
	Osteopenia	Normale	0,225023	0,5
		Osteoporosi	0,353045	0,502
Osteoporosi	Normale	0,351201	0,912	
	Osteopenia	0,353045	0,502	
VitB12_mcg	Normale	Osteopenia	0,472399	0,81
		Osteoporosi	0,737289	0,88
	Osteopenia	Normale	0,472399	0,81
		Osteoporosi	0,74116	0,659
Osteoporosi	Normale	0,737289	0,88	
	Osteopenia	0,74116	0,659	
Fibra_g	Normale	Osteopenia	1,80567	0,004
		Osteoporosi	2,818174	0,195
	Osteopenia	Normale	1,80567	0,004
		Osteoporosi	2,832968	0,919
Osteoporosi	Normale	2,818174	0,195	
	Osteopenia	2,832968	0,919	
Carboidrati/die_g	Normale	Osteopenia	15,50816	0,374
		Osteoporosi	24,20415	0,75
	Osteopenia	Normale	15,50816	0,374
		Osteoporosi	24,33121	0,263
Osteoporosi	Normale	24,20415	0,75	
	Osteopenia	24,33121	0,263	
Proteine/die_g	Normale	Osteopenia	4,057646	0,227
		Osteoporosi	6,332915	0,954
	Osteopenia	Normale	4,057646	0,227
		Osteoporosi	6,366159	0,72
Osteoporosi	Normale	6,332915	0,954	
	Osteopenia	6,366159	0,72	
Lipidi/die_g	Normale	Osteopenia	3,060352	0,993
		Osteoporosi	4,776402	0,999
	Osteopenia	Normale	3,060352	0,993
		Osteoporosi	4,801476	0,999
Osteoporosi	Normale	4,776402	0,999	
	Osteopenia	4,801476	0,999	

		Osteopenia	4,801476	0,999
Kcal/die	Normale	Osteopenia	84,87182	0,406
		Osteoporosi	132,4625	0,904
	Osteopenia	Normale	84,87182	0,406
		Osteoporosi	133,1579	0,43
	Osteoporosi	Normale	132,4625	0,904
		Osteopenia	133,1579	0,43

Tabella 28: ANOVA univariata, studio delle differenze nell'assunzione di nutrienti tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici e osteoporotici

Valutazione delle differenze nel microbiota orale tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici ed osteoporotici

Effettuando un test ANOVA univariata e relativi test post hoc, siamo poi andati ad esplorare le differenze in termini di specie microbiche presenti a livello buccale, legate alla malattia parodontale, tra soggetti con densità minerale ossea ottimale, osteopenici ed osteoporotici.

Tali analisi sono state effettuate sia attraverso l'utilizzo di variabili continue (copie di materiale genetico microbico/uL di campione analizzato), sia attraverso variabili discrete (definizione di concentrazione patologica con valori superiori a 10^3 copie/uL).

Le differenze significative tra i diversi gruppi, in termini di copie di materiale genetico su uL di campione analizzato sono le seguenti (tab. 29):

- *P. gingivalis* presenta una differenza di concentrazione significativa tra soggetti osteopenici ed osteoporotici (più copie/uL);
- *T. denticola* presenta una differenza di concentrazione significativa tra soggetti normali (più copie/uL) e osteopenici;

Variabile dipendente		Esito mineralometria	Esito mineralometria	Sig.
(copie/μl) A. actinomycetemcomitans	Normale	Osteopenia		0,65
		Osteoporosi		1
	Osteopenia	Normale		0,65
		Osteoporosi		0,787
(copie/μl) P. gingivalis	Normale	Osteopenia		0,853
		Osteoporosi		0,114
	Osteopenia	Normale		0,853
		Osteoporosi		0,035
Osteoporosi	Normale		0,114	
	Osteopenia		0,035	

(copie/μl) P. endodontalis	Normale	Osteopenia	0,997
		Osteoporosi	0,499
	Osteopenia	Normale	0,997
		Osteoporosi	0,503
	Osteoporosi	Normale	0,499
Osteopenia		0,503	
(copie/μl) T. forsythensis	Normale	Osteopenia	0,999
		Osteoporosi	0,992
	Osteopenia	Normale	0,999
		Osteoporosi	0,986
	Osteoporosi	Normale	0,992
Osteopenia		0,986	
(copie/μl) T. denticola	Normale	Osteopenia	0,034
		Osteoporosi	0,764
	Osteopenia	Normale	0,034
		Osteoporosi	0,444
	Osteoporosi	Normale	0,764
Osteopenia		0,444	
(copie/μl) P. micros	Normale	Osteoporosi	0,579
		Osteopenia	0,329
	Osteopenia	Normale	0,998
		Osteoporosi	0,579
	Osteoporosi	Normale	0,579
Osteopenia		0,998	
(copie/μl) F. alocis	Normale	Osteopenia	0,726
		Osteoporosi	0,527
	Osteopenia	Normale	0,726
		Osteoporosi	0,847
	Osteoporosi	Normale	0,527
Osteopenia		0,847	
(copie/μl) Synergistetes	Normale	Osteopenia	0,685
		Osteoporosi	0,996
	Osteopenia	Normale	0,685
		Osteoporosi	0,85
	Osteoporosi	Normale	0,996
Osteopenia		0,85	

(copie/μl) <i>P. intermedia</i>	Normale	Osteopenia	0,217
		Osteoporosi	0,774
	Osteopenia	Normale	0,217
		Osteoporosi	0,829
	Osteoporosi	Normale	0,774
Osteopenia		0,829	
(copie/μl) <i>F. nucleatum</i>	Normale	Osteopenia	0,996
		Osteoporosi	0,14
	Osteopenia	Normale	0,996
		Osteoporosi	0,135
	Osteoporosi	Normale	0,14
Osteopenia		0,135	
(copie/μl) <i>C. rectus</i>	Normale	Osteopenia	0,93
		Osteoporosi	0,292
	Osteopenia	Normale	0,93
		Osteoporosi	0,157
	Osteoporosi	Normale	0,292
Osteopenia		0,157	
(copie/μl) <i>R. dentocariosa</i>	Normale	Osteopenia	0,958
(copie/μl) <i>R. dentocariosa</i>	Normale	Osteoporosi	0,645
		Osteopenia	0,958
	Osteopenia	Normale	0,958
		Osteoporosi	0,488
	Osteoporosi	Normale	0,645
Osteopenia		0,488	
(copie/μl) <i>L. hofstadii</i>	Normale	Osteopenia	0,478
		Osteoporosi	0,953
	Osteopenia	Normale	0,478
		Osteoporosi	0,837
	Osteoporosi	Normale	0,953
Osteopenia		0,837	
(copie/μl) <i>E. corrodens</i>	Normale	Osteopenia	0,491
		Osteoporosi	0,958

	Osteopenia	Normale	0,491
		Osteoporosi	0,825
	Osteoporosi	Normale	0,958
		Osteopenia	0,825
(copie/μl) C. hominis	Normale	Osteopenia	0,628
		Osteoporosi	0,995
	Osteopenia	Normale	0,628
		Osteoporosi	0,82
	Osteoporosi	Normale	0,995
		Osteopenia	0,82

Tabella 29: ANOVA univariata, valutazione delle differenze nel microbiota orale tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici ed osteoporotici

I dati appena riportati vanno poi confrontati anche con le analisi discrete, poiché siamo sempre in presenza di soggetti patologici, quindi con valori di concentrazioni microbiche superiori a 10^3 copie/ul.

Dalle analisi discrete, effettuate tramite test del chi quadrato (grafici 10, 11) emerge che:

- P. micros presenta valori molto più patologici nei soggetti osteoporotici in termini di significatività rispetto agli altri due gruppi;
- F.alocis, ha una tendenza per cui i soggetti osteoporotici hanno valori molto più patologici rispetto agli altri due gruppi.

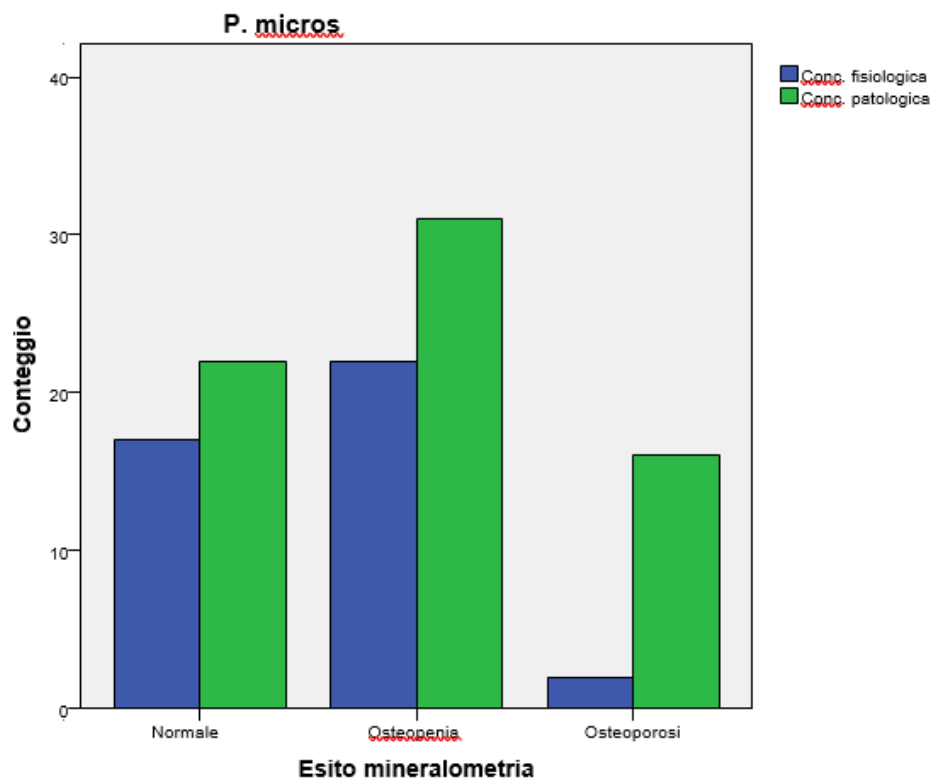


Grafico 10: Valutazione delle differenze nel microbiota orale tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici ed osteoporotici - *P. micros*

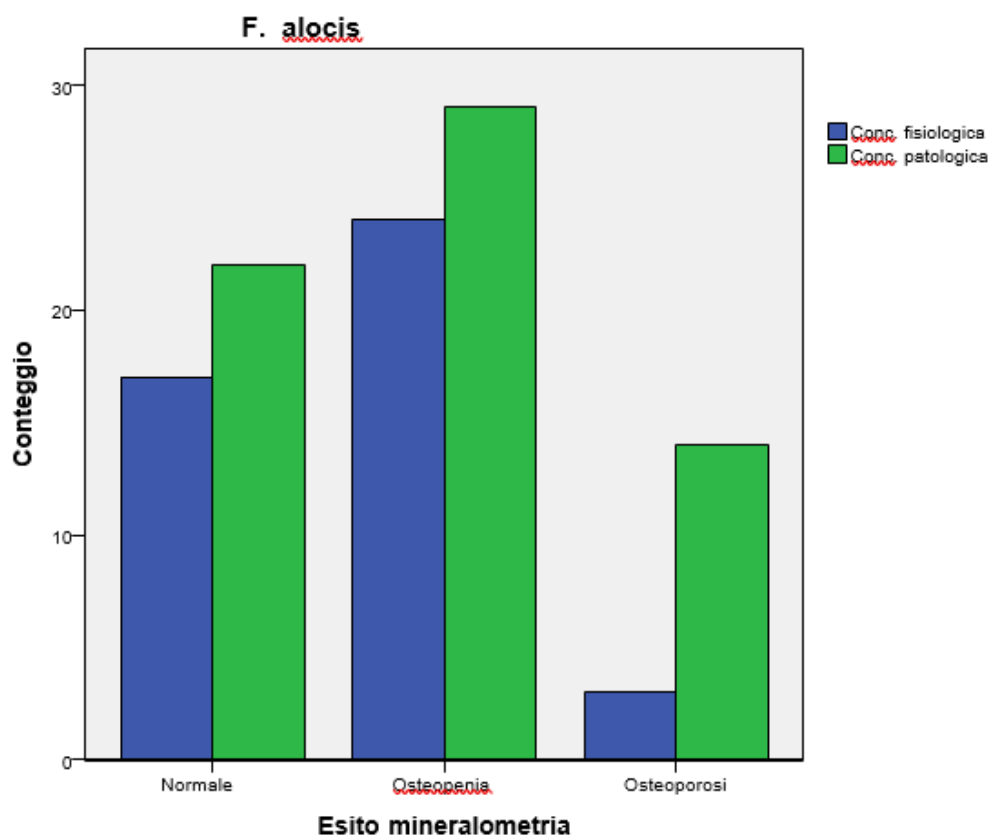


Grafico 11: Valutazione delle differenze nel microbiota orale tra soggetti con normale densità ossea, osteopenici ed osteoporotici - *F. alocis*

Dalle altre analisi non sono emerse differenze significative.

Ulteriori analisi di significatività

Oltre alle analisi sopra riportate, è stato valutato tramite test statistici opportuni se esistevano differenze significative nell'espressione dei polimorfismi dei geni descritti precedentemente tra soggetti con valori di densità ossea normale, osteopenici ed osteoporotici, ma in nessun caso si sono avuti risultati significativi.

Inoltre si è indagato se esistessero differenze significative nei valori di t-score, valori ematici di PTH e 25OHD3 tra soggetti che presentavano diversa espressione nei polimorfismi dei geni analizzati, ma anche in questo caso le analisi eseguite non hanno prodotto esiti significativi.

Statistiche inferenziali – Correlazioni

Valutazione delle correlazioni tra profondità di tasca (PPD) e t-score

Tramite il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman si è indagato se esistesse una correlazione tra i valori della profondità di tasca nella popolazione e i valori dei t-score rilevati con i diversi strumenti utilizzati:

- per i valori ottenuti tramite esame MOC, si osserva che, all'aumentare del valore del t-score lombare, aumenta il valore di profondità di tasca parodontale; tuttavia i dati su cui è stata effettuata l'analisi sono molto pochi (N = 15) (tab. 30);
- per i valori ottenuti tramite QUS invece, all'aumentare del valore di t-score piede sinistro, si ha una diminuzione della profondità di tasca parodontale (N = 99) (tab. 31).

			Tscore lumbar
Rho di Spearman	PPD (mm)	Coefficiente di correlazione	,468
		Sig. (2-code)	,079
		N	15

Tabella 30: correlazione per ranghi di Spearman, valutazione delle correlazioni tra profondità di tasca (PPD) e t-score (1)

			PPD (mm)
Rho di Spearman	Tscore piede sx	Coefficiente di correlazione	-,200*
		Sig. (2-code)	,047
		N	99

Tabella 31: correlazione per ranghi di Spearman, valutazione delle correlazioni tra profondità di tasca (PPD) e t-score (2)

Le analisi divise per genere non sono state effettuate per l'esigua numerosità del campione in oggetto.

Valutazione della correlazione tra recessione gengivale (REC) e t-score

Tramite il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman si è indagato se esistesse una correlazione tra i valori della profondità di tasca nella popolazione e i valori dei t-score rilevati con i diversi strumenti utilizzati:

- per i valori ottenuti tramite esame MOC, si osserva che, all'aumentare del valore di t-score lombare e femorale (collo), diminuisce il valore di REC; anche in questo caso tuttavia la numerosità del campione è molto bassa per ottenere un dato oggettivo (N = 13) (tab. 32).

- le analisi effettuate utilizzando i dati ottenute tramite QUS non hanno prodotto esiti significativi.

			Tscore femore tot	Tscore femore collo
Rho di Spearman	REC media (mm)	Coefficiente di correlazione	-,330	-,399
		Sig. (2-code)	,271	,158
		N	13	14
Tscore lumbar		Coefficiente di correlazione	,911	,681
		Sig. (2-code)	,000	,007
		N	13	14
Tscore femore tot		Coefficiente di correlazione	1,000	,871 ^{**}
		Sig. (2-code)	.	,000
		N	13	13
Tscore femore collo		Coefficiente di correlazione	,871 ^{**}	1,000
		Sig. (2-code)	,000	.
		N	13	14
Tscore piede dx		Coefficiente di correlazione	,949	,400
		Sig. (2-code)	,051	,600
		N	4	4
Tscore piede sx		Coefficiente di correlazione	,316	-,400
		Sig. (2-code)	,684	,600
		N	4	4

Tabella 32: Coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman, valutazione della correlazione tra recessione gengivale (REC) e t-score

Valutazione delle correlazioni tra indice di placca e t-score

Tramite il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman si è indagato se esistesse una correlazione tra i valori della profondità di tasca nella popolazione e i valori dei t-score rilevati con i diversi strumenti utilizzati:

- per i valori ottenuti tramite QUS, all'aumentare del valore di t-score piede sinistro e piede destro, si assiste ad un aumento dell'indice di placca (tab. 33);
- le analisi sui valori della MOC non hanno dato esito significativo, avendo a disposizione un numero troppo esiguo di casi.

			Indice_Placca
Rho di Spearman	Indice_Placca	Coefficiente di correlazione	1,000
		Sig. (2-code)	.
		N	97
	Tscore lumbar	Coefficiente di correlazione	-,395
		Sig. (2-code)	,293
		N	9
	Tscore femore tot	Coefficiente di correlazione	-,170
Sig. (2-code)		,688	
N		8	
Tscore femore collo	Coefficiente di correlazione	-,084	
	Sig. (2-code)	,829	
	N	9	
Tscore piede dx	Coefficiente di correlazione	,243 *	
	Sig. (2-code)	,023	
	N	87	
Tscore piede sx	Coefficiente di correlazione	,328 **	
	Sig. (2-code)	,002	
	N	88	

Tabella 33: Correlazione di Spearman, valutazione delle correlazioni tra indice di placca e t-score

Valutazione delle correlazioni tra l'indice di placca e l'assunzione di nutrienti (Calcio, Carboidrati e vitamina C)

Tramite il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman si è indagato se esistesse una correlazione tra i valori di assunzione di determinati nutrienti importanti per la salute delle ossa e dei denti (calcio, carboidrati e vitamina C) e i valori dell'indice di placca (tab. 34):

- al diminuire del valore di assunzione della vitamina C, aumenta il valore dell'indice di placca nell'intera popolazione;
- per Calcio e Carboidrati, non si osserva correlazione per una numerosità campionaria troppo bassa.

			Indice_Placca
Rho di Spearman	Indice_Placca	Coefficiente di correlazione	1,000
		Sig. (2-code)	.
		N	97
	VitC_mg	Coefficiente di correlazione	-,385*
		Sig. (2-code)	,025
		N	34
	Carboidrati/die_g	Coefficiente di correlazione	-,176
		Sig. (2-code)	,318
		N	34
	Ca/die_mg	Coefficiente di correlazione	-,199
		Sig. (2-code)	,259
		N	34

Tabella 34: Correlazione di Spearman, valutazione delle correlazioni tra l'indice di placca e l'assunzione di nutrienti (Calcio, Carboidrati e vit C)

Valutazione delle correlazioni tra l'introito di nutrienti e le concentrazioni microbiche

Tramite il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman si è indagato se esistesse una correlazione tra i valori di assunzione di determinati nutrienti e le concentrazioni dei microrganismi rilevate (tab.35):

- A. actynomicetemcomitans ha mostrato una correlazione positiva con i valori di assunzione di vit D e vit B12;
- P. endodontalis ha mostrato un trend negativo con i valori di assunzione di Fe, Mg e fibre alimentari;
- T. forsythensis ha mostrato una correlazione positiva con i valori di assunzione dei lipidi;
- F. alocis ha mostrato una correlazione positiva con i valori di assunzione di vit D;
- L. hofstadii ha mostrato un trend negativo con i valori di assunzione di Mg, K e fibre alimentari;
- E. corrodens ha mostrato un trend positivo con i valori di assunzione di Fe, Na, fibre alimentari;
- C. hominis ha mostrato un trend negativo con i valori di assunzione di Fe, Mg e K.

Le altre analisi non hanno evidenziato correlazioni significative.

Microrganismo	Correlazione di Spearman	Ca/die	P/die	Na/die	Fe/die	Mg/die	K/die
A. actinomycetemcomitans	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
P. gingivalis	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
P. endodontalis	Rho	-	-	-	-0,273	-0,308	-
	p	-	-	-	0,076	0,045	-
T. forsythensys	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
T. denticola	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
P. micros	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
F. alocis	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
Synergistetes	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
P. intermedia	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
F. nucleatum	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
C. rectus	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
R. dentocariosa	Rho	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-
L. hofstadii	Rho	-	-	-	-	-0,252	-0,251
	p	-	-	-	-	0,1	0,104
E. corrodens	Rho	-	-	0,283	0,258	-	-
	p	-	-	0,063	0,091	-	-
C. hominis	Rho	-	-	-	-0,259	-0,255	0,25
	p	-	-	-	0,093	0,099	0,106

Microorganismo	Correlazione di Spearman	Se/die	Zn/die	VitC/die	VitD/die	VitB12/die	Carboidrati/die	Proteine/die	Lipidi/die	Fibra/die
A. actinomycetemcomitans	Rho	-	-	-	0,299	0,342	-	-	-	-
	p	-	-	-	0,048	0,023	-	-	-	-
P. gingivalis	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. endodontalis	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,31
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	0,043
T. forsythensis	Rho	-	-	-	-	-	-	-	0,3119	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	0,035	-
T. denticola	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. micros	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. alocis	Rho	-	-	-	0,354	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-
Synergistetes	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. intermedia	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. nucleatum	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. rectus	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. dentocariosa	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. hofstadii	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,262
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	0,089
E. corrodens	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	0,267
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	0,079
C. hominis	Rho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 35: Correlazione di Spearman, valutazione delle correlazioni tra l'introito di nutrienti e le concentrazioni microbiche (variabili continue)

Abbiamo poi eseguito una analisi di correlazione utilizzando anche le variabili discrete che descrivono se i microrganismi si trovano in un range di concentrazione fisiologico o patologico (tab. 36)

In questo caso il test eseguito è stato un t-test di Student per campioni indipendenti.

In questo caso i risultati ottenuti sono i seguenti:

- per *A. actynomicetemcomitans*, chi presenta valori fisiologici sembra assumere meno vit D e vit B12 di chi è considerato patologico;
- per *T. denticola*, chi presenta valori fisiologici sembra assumere meno vit B12 di chi è considerato patologico;
- per *F. nucleatum*, chi presenta valori fisiologici sembra assumere meno Ca, P, Na, Fe, Mg, K, Zn, fibra alimentare, proteine, lipidi e Kcal;
- per *R. dentocariosa* chi presenta valori fisiologici sembra assumere meno vit D e vit B12 di chi è considerato patologico;
- per *E. corrodens* chi presenta valori fisiologici sembra assumere meno Na di chi è considerato patologico.

A. actinomycetemcomitans		N	Media	Deviazione st.
VitD/die	fisiologico	39	1,667533	0,7301753
	patologico	5	2,049114	0,3032195
VitB12/die	fisiologico	39	3,739656	1,5046432
	patologico	5	4,651029	0,6265939
T. denticola				
VitB12/die	fisiologico	23	3,418292	1,3780206
	patologico	21	4,308619	1,428347
F. nucleatum				
Ca/die	fisiologico	6	561,9627	158,8333573
	patologico	38	792,09993	330,7328379
P/die	fisiologico	6	730,92858	158,1203364
	patologico	38	963,25195	233,5148599
Na/die	fisiologico	6	684,57989	104,0800378
	patologico	38	1019,2375	349,4481361
Fe/die	fisiologico	6	6,101774	1,908159
	patologico	38	8,176647	2,5078255
Mg/die	fisiologico	6	138,33589	39,8748036
	patologico	38	177,11065	53,5268047
K/die	fisiologico	6	1725,0704	415,7709153
	patologico	38	2165,8656	683,6824492
Zn/die	fisiologico	6	6,49081	1,5372708
	patologico	38	8,713613	2,1707222
Fibra/die	fisiologico	6	12,580857	3,4983495
	patologico	38	16,370143	6,5372115
Proteine/die	fisiologico	6	40,245869	11,7436914
	patologico	38	54,179241	12,0653804
Lipidi/die	fisiologico	6	20,275798	2,1048104
	patologico	38	29,921829	9,3555291
R. dentocariosa				
VitD/die	fisiologico	25	1,514626	0,6871882
	patologico	18	2,001869	0,6572245
VitB12/die	fisiologico	25	3,480269	1,3564272
	patologico	18	4,398175	1,4842197
E. corrodens				
Na/die	fisiologico	16	832,74074	307,9430906
	patologico	28	1054,0947	345,9503272

Tabella 36: *t-test di Student, Correlazione di Spearman, valutazione delle correlazioni tra l'introito di nutrienti e le concentrazioni microbiche (variabili discrete)*

Valutazione della correlazione tra concentrazioni di MMP-8, profondità di tasca e recessione gengivale

Tramite il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman si è indagato se esistesse una correlazione tra i valori della profondità di tasca nella popolazione e i valori di MMP-8 (tab. 37):

- i valori di PPD hanno una correlazione positiva con quelli del dosaggio della MMP-8 nella popolazione;
- non sono risultate correlazioni significative con i valori di REC.

			MMP-8 (ng/mL)
Rho di Spearman	REC media (mm)	Coefficiente di correlazione	,073
		Sig. (2-code)	,461
		N	104
	PPD media (mm)	Coefficiente di correlazione	,317
		Sig. (2-code)	,001
		N	104

Tabella 37: Correlazione di Spearman, valutazione della correlazione tra concentrazioni di MMP-8, profondità di tasca e recessione gengivale

Valutazione della correlazione tra concentrazioni di MMP-8 e concentrazioni microbiche

Tramite il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman si è indagato se esistesse una correlazione tra i valori delle concentrazioni microbiche nella popolazione e i valori di MMP-8 (tab. 38):

- correlazione positiva (0,33) tra *P. gingivalis* e MMP-8;
- correlazione positiva (0,22) tra *P. endodontalis* e MMP-8;
- correlazione positiva (0,21) tra *T. forsythensys* e MMP-8;
- correlazione positiva (0,27) tra *T. denticola* e MMP-8;
- correlazione positiva (0,39) tra *Synergistetes* e MMP-8;
- correlazione positiva (0,2) tra *F. nucleatum* e MMP-8.

			MMP-8 (ng/mL)
Rho di Spearman	MMP-8 (ng/mL)	Coefficiente di correlazione	1,000
		Sig. (2-code)	.
		N	104
	(copie/μl) <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Coefficiente di correlazione	,067
		Sig. (2-code)	,500
		N	104
	(copie/μl) <i>P. gingivalis</i>	Coefficiente di correlazione	,333
		Sig. (2-code)	,001
		N	104
	(copie/μl) <i>P. endodontalis</i>	Coefficiente di correlazione	,220
		Sig. (2-code)	,026
		N	103
	(copie/μl) <i>T. forsythensys</i>	Coefficiente di correlazione	,208
		Sig. (2-code)	,034
		N	104
	(copie/μl) <i>T. denticola</i>	Coefficiente di	,274

	correlazione		,005
	Sig. (2-code)		104
	N		
(copie/μl) P. micros	Coefficiente di correlazione		,272
	Sig. (2-code)		,005
	N		104
(copie/μl) F. alocis	Coefficiente di correlazione		,150
	Sig. (2-code)		,131
	N		103
(copie/μl) Synergistetes	Coefficiente di correlazione		,393
	Sig. (2-code)		,000
	N		103
(copie/μl) P. intermedia	Coefficiente di correlazione		,042
	Sig. (2-code)		,673
	N		104

			MMP-8 (ng/mL)
Rho di Spearman	(copie/μl) F. nucleatum	Coefficiente di correlazione	,198 *
		Sig. (2-code)	,044
		N	104
	(copie/μl) C. rectus	Coefficiente di correlazione	,045
		Sig. (2-code)	,651
		N	103
	(copie/μl) R. dentocariosa	Coefficiente di correlazione	-,047
	Sig. (2-code)	,639	
	N	103	
(copie/μl) L. hofstadii	Coefficiente di correlazione	,035	
	Sig. (2-code)	,728	
	N	103	
(copie/μl) E. corrodens	Coefficiente di correlazione	-,129	
	Sig. (2-code)	,192	
	N	104	
(copie/μl) C. hominis	Coefficiente di correlazione	-,014	
	Sig. (2-code)	,885	
	N	103	

Tabella 38: Correlazioni di Spearman, valutazione della correlazione tra concentrazioni di MMP-8 e concentrazioni microbiche

Valutazione della correlazione tra il polimorfismo TaqI del gene VDR rispetto al grading della malattia parodontale

Attraverso una valutazione effettuata tramite tavole di contingenza, possiamo osservare che i soggetti che presentano polimorfismo per TaqI del gene VDR aa, hanno una maggiore severità della patologia parodontale rispetto a Aa e AA (tab 39).

			Parodontite (Amitage CG 1999)			Totale
			TT	Tt	tt	
Taq1	TT	Conteggio	10	9	7	26
		% entro Taq1	38,5%	34,6%	26,9%	100,0%
	Tt	Conteggio	8	28	23	59
		% entro Taq1	13,6%	47,5%	39,0%	100,0%
	tt	Conteggio	0	9	6	15
		% entro Taq1	,0%	60,0%	40,0%	100,0%
Totale	Conteggio	18	46	36	100	
	% entro Taq1	18,0%	46,0%	36,0%	100,0%	

Tabella 39: Tavole di contingenza, valutazione della correlazione tra il polimorfismo TaqI del gene VDR rispetto al grading della malattia parodontale

Ulteriori analisi di correlazione

Abbiamo provato anche ad eseguire analisi di correlazione tra i polimorfismi dei geni analizzati e i valori di t-core, ma non sono risultate analisi significative.

Lo stesso risultato si è ottenuto cercando di correlare gli altri polimorfismi genici di VDR presi in considerazione con il grading della malattia parodontale; l'esito delle analisi è stato non significativo.

Riguardo all'indice di placca, si è indagato se esistessero delle relazioni tra questo parametro e le concentrazioni microbiche legate alla parodontite, senza esiti significativi.

Lo stesso indice è stato messo poi in relazione all'abitudine al fumo, il valore del BMI, all'espressione dei polimorfismi di IL-1, IL-10 e TNF- α e infine ai valori del dosaggio della MMP-8, dando però esiti non significativi.

Discussione

Valutazioni descrittive

I dati raccolti ci mostrano che la popolazione coinvolta per questo studio è costituita da un gruppo di soggetti tendenzialmente appartenenti alla fascia di età over 50, con valori di BMI all'interno dell'intervallo raccomandato, sia per la popolazione maschile, sia per quella femminile. Nel sottogruppo a cui è stato possibile somministrare il questionario anamnestico si evidenzia una popolazione tendenzialmente "in salute", che dichiara ben poche patologie e trattamenti farmacologici. Le condizioni patologiche più frequentemente dichiarate sono state malattie della tiroide (18,9%) e ipertensione (16,2%). Da sottolineare come più del 95% della popolazione abbia dichiarato di seguire un regime alimentare "onnivoro", per cui è stato impossibile confrontare se diversi regimi alimentari predisponessero a determinate differenze nei parametri analizzati. La stessa considerazione può essere fatta anche per il consumo di bevande alcoliche, fattore di rischio sia per l'insorgenza della malattia osteoporotica, sia di quella parodontale, ma che è stato dichiarato solamente dal 24,3 % della

popolazione. Concentrandosi sulla popolazione femminile, sia l'età del menarca, sia quella della menopausa (per chi in menopausa) è risultata in linea con le età medie d'insorgenza. I dati relativi al turnover osseo e ai valori mineralometrici ci descrivono una popolazione con valori ematici di PTH, calcemia e fosfatemia tendenzialmente in linea con i valori desiderabili, ma con valori di 25OHD3 al di sotto del valore ottimale. Inoltre, i valori di t-score sia della QUS che della MOC, ove disponibile, identificano una popolazione prevalentemente costituita da soggetti fragili dal punto di vista del rischio di frattura e osteoporosi, con un minor numero di soggetti con valori tendenti alla normalità, che sono poi stati confrontati per le variabili in studio con i soggetti più fragili.

Valutazioni in ambito nutrizionale

La popolazione che ha risposto al questionario alimentare ha mostrato delle abitudini alimentari che non soddisfano i livelli di assunzione raccomandata dai L.A.R.N.. Nutrienti importanti per la salute delle ossa e rilevanti per la prevenzione della malattia parodontale e della salute della bocca in generale, come calcio, ferro, magnesio, potassio e fibre sono risultati al di sotto dei valori raccomandati; non a caso tali nutrienti si assumono principalmente dagli alimenti di origine vegetale, come frutta verdura e legumi, alimenti che si sono rivelati carenti nelle abitudini di consumo della popolazione, sia per quanto riguarda la frequenza di consumo, sia per le porzioni. Per il calcio, è interessante notare come nella nostra popolazione tale nutriente derivi soprattutto dall'assunzione di formaggi che tuttavia apportano anche nutrienti pericolosi per la salute se in eccesso, in particolare colesterolo e trigliceridi, piuttosto che dal consumo di alimenti più magri come latte e yogurt, che la popolazione ha dimostrato di consumare in media molto meno frequentemente. Tale situazione focalizza l'attenzione sulla necessità di sensibilizzare maggiormente i pazienti ad una educazione alimentare più consapevole; in tale situazione il personale odontoiatrico potrebbe svolgere in futuro un ruolo rilevante come tramite nei confronti di figure specialistiche della nutrizione, come nutrizionisti, dietologi e dietisti che possano così seguire i pazienti e prevenire eventuali squilibri nutrizionali che possano predisporre a tutta una serie di patologie, quali osteoporosi, la stessa parodontite, ma anche dismetabolismi ed ipertensione. Dalle analisi di significatività e correlazione sono emersi risultati piuttosto rilevanti; nello specifico sembra che i soggetti che presentano valori di t-score più bassi, quindi predisponenti ad un maggior rischio di fragilità ossea, abbiano un'assunzione in media non soddisfacente, ma comunque più elevata di molti nutrienti importanti per la salute delle ossa che abbiamo già citato (Fe, Mg, K, vit C, fibre). Questo risultato potrebbe essere spiegato dal fatto che un soggetto già definito a rischio di sviluppare una patologia sia già stato sensibilizzato, almeno in parte, sull'importanza dell'alimentazione nella prevenzione di queste patologie dal proprio medico di base o comunque dal personale sanitario che ha incontrato. La vera prevenzione primaria, quella sui soggetti sani, risulterebbe quindi un elemento di maggiore criticità, poiché le persone che ancora non percepiscono un problema, tenderebbero a essere meno attenti alle proprie abitudini alimentari. Per questo sarebbe fondamentale in prospettiva futura potenziare la consapevolezza delle scelte alimentari anche nei soggetti sani, in modo da prevenire eventuali carenze e sviluppi patologici futuri.

Altro risultato di sicuro interesse lo si è ottenuto invece in merito alla relazione tra assunzione di nutrienti e indice di placca, fattore che ci descrive la gravità della malattia parodontale. Dalle analisi di correlazione effettuate risulta che nella popolazione, maggiore è l'assunzione di vitamina C attraverso l'alimentazione e minore risulta essere il valore di indice di placca. Questo risultato potrebbe rafforzare l'evidenza che esiste a livello scientifico di un fattore protettivo nell'insorgenza della patologia parodontale da parte del consumo di vitamina C che ad oggi risulta ancora oggetto di indagine e discussione (Hytham N. Fageeh, 2021) (Miura, 2019). Una volta consolidata questo aspetto, ci si potrebbe poi concentrare anche sul ruolo di questa vitamina nella prevenzione della malattia osteoporotica (Olga Brzezińska, 2020), altro aspetto attualmente oggetto di indagine e definirne

l'importanza nella prevenzione delle due patologie. Inoltre, lo stesso tipo di tendenza si sarebbe osservata anche per l'assunzione di Calcio, ma sarebbe necessario una numerosità campionaria maggiore per rendere significativo questo effetto. In futuro ci auguriamo di poter approfondire anche la relazione di questo nutriente con la prevenzione della malattia parodontale, già fondamentale nella prevenzione della salute dell'osso.

Si è poi tentato di indagare se l'assunzione alimentare di determinati nutrienti possa in qualche modo influenzare la presenza delle specie microbiche da noi analizzate associate alla malattia parodontale. Le analisi di correlazione effettuate, come mostrato, hanno prodotto esiti molto variegati in senso sia positivo che negativo rispetto a vari nutrienti, oltre ad esiti invece non significativi. Questo tipo di ambito di ricerca è tutt'ora molto poco esplorato, e non è facile trarre particolari conclusioni. Innanzi tutto bisogna considerare la presenza di moltissimi fattori confondenti che rendono difficile trarre delle conclusioni. Per adesso possono risultare come dati descrittivi ed ipotesi di sicuro interesse, ma saranno necessarie ulteriori analisi in futuro per ottenere maggiori conclusioni.

Valutazioni in ambito parodontale e osseo

Presupposto dei soggetti reclutati per la partecipazione allo studio è stato quello di essere affetti da malattia parodontale; su questo frangente, analizzando il campione, si nota che le forme maggiormente rappresentate, sono essenzialmente di natura cronica piuttosto che aggressive, specialmente di tipo moderato o addirittura avanzato, con elevati valori di recessione gengivale e profondità di tasca parodontale nei siti di sondaggio. Purtroppo, le analisi di correlazione che sono state eseguite in merito alla relazione tra le variabili che descrivono il livello di gravità della malattia parodontale (ovvero indice di placca, PPD, REC) e le variabili relative allo stato di salute dell'osso hanno prodotto esiti non significativi. Infatti i risultati che abbiamo ottenuto e mostrato, sembrano viziati anche in questo caso da una numerosità campionaria ridotta, soprattutto per quanto riguarda i valori raccolti tramite MOC, senz'altro lo strumento più attendibile e validato. La speranza è che in futuro, avendo la possibilità di uniformare i dati sulla densità ossea e lavorare al di fuori di una situazione pandemica che consenta una numerosità campionaria più elevata, si possano evidenziare relazioni più marcate ed evidenti tra le due patologie oggetto dello studio.

Un risultato più marcato di correlazione significativa si è ottenuto in merito all'andamento dei valori di recessione gengivale rispetto al dosaggio della MMP-8. Si è osservata infatti una correlazione positiva tra le due variabili, che sembrano quindi collegate nell'evoluzione della patologia parodontale. MMP-8 potrebbe quindi senz'altro essere considerato un marker per descrivere il livello di infiammazione associato all'andamento della recessione gengivale nel decorso della malattia parodontale (Lin Zhang, 2018).

Valutazioni in ambito microbiologico

Spostando l'attenzione sull'analisi del microbiota, era logico aspettarsi che le specie microbiche legate alla malattia parodontale maggiormente rappresentate risultassero quelle di solito associate alla patologia grave ed avanzata nella popolazione in oggetto; ed infatti come osservato, le specie associate al complesso rosso e/o arancione di Socransky sono praticamente ubiquitarie in quasi tutti i soggetti testati, con valori di concentrazioni quasi sempre al di sopra della "soglia di patogenicità", definita da 10^3 copie/mL. Una situazione tale dovrebbe evidenziare anche uno status infiammatorio assai elevato a livello della cavità buccale; tale supposizione è stata confermata dal dosaggio eseguito sulle concentrazioni di MMP-8 a livello dei siti di sondaggio, con concentrazioni medie assai elevate, a testimonianza di un importante processo flogistico in evoluzione nella popolazione in studio. L'analisi

delle correlazioni, eseguita come mostrato, sia attraverso variabili continue sia per mezzo di variabili discrete, ci ha mostrato dei dati interessanti rispetto alle concentrazioni di *P. micros* e *F. alocis* nelle diverse categorie di soggetti con normali valori di t-score, osteopenici ed osteoporotici. Infatti per queste due specie microbiche prevalentemente associate a forme cronico-avanzate di malattia parodontale si osserva una tendenza per cui passando da valori di t-score normali verso valori più patologici, si assiste ad un marcato aumento di concentrazioni microbiche di queste due specie. Ulteriori analisi su campioni maggiormente numerosi potrebbero in futuro rafforzare questa relazione e mettere in evidenza l'importanza di un fattore microbico nella relazione che esiste tra la patologia osteoporotica e quella parodontale. Per altre specie batteriche non si sono invece osservati risultati significativi, ma ciò potrebbe esser stato dato da una numerosità campionaria comunque contenuta che ha quindi disperso l'effetto.

Abbiamo già affrontato l'importanza del dosaggio salivare di MMP-8 nel descrivere lo stato di avanzamento della malattia parodontale e in particolare lo stato infiammatorio a livello del cavo orale. Ci siamo quindi proposti di esplorare eventuali correlazioni tra questo marker e le specie microbiche coinvolte nell'ezio-patogenesi della malattia parodontale. Le analisi hanno prodotto alcuni risultati soddisfacenti; infatti alcune specie microbiche, in particolare *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, *Synergistetes* e *F. Nucleatum* hanno mostrato una correlazione positiva tra le loro concentrazioni e quelle di MMP-8. MMP-8 si conferma essere un marker infiammatorio associato alla parodontite e alla risposta infiammatoria espressa a livello della bocca (Simon J Stone 1, 2018).

Valutazioni in ambito genetico

Si sono poi analizzate le caratteristiche della popolazione per quanto riguarda l'espressione di polimorfismi caratteristici di alcuni dei principali marker coinvolti nel processo infiammatorio, ovvero IL-1, IL-10 e TNF- α , che si ritrovano costantemente rilevati a livello buccale durante lo sviluppo dei processi flogistici associati alla malattia parodontale. Le stesse analisi sono state ripetute anche per i polimorfismi del gene codificante il recettore della vitamina D, per esplorare la presenza di particolari predisposizioni che possano influenzare i livelli di densità minerale ossea e/o la predisposizione all'insorgenza della malattia parodontale stessa. L'espressione dei polimorfismi legati ai marker del processo infiammatorio ha prodotto dei risultati diversi a seconda del marker preso in considerazione; la popolazione sembra presentare prevalentemente polimorfismi predisponenti ad un maggior livello di infiammazione per quanto riguarda IL-1, ma ha espresso una prevalenza di polimorfismi non predisponenti a un maggiore livello infiammatorio per quanto riguarda IL-10 e TNF- α . Per quanto riguarda l'analisi dei polimorfismi del recettore per la vit D, dal punto di vista descrittivo, esse hanno segnalato una popolazione che ha espresso maggiormente quei polimorfismi che nella letteratura scientifica sono associati ad un maggior rischio di insorgenza di fragilità ossea e predisposizione alla malattia parodontale (Melissa Kow, 2019). Purtroppo tali analisi, a causa di una ridotta numerosità campionaria e di numerosi fattori confondenti che hanno portato a valori di deviazione standard della variabile t-score troppo elevati, non hanno prodotto esiti definitivi quando siamo andati a eseguire analisi di correlazione con le variabili di interesse, ma i risultati descrittivi riportati potranno fungere comunque da base per ulteriori analisi future con una maggiore numerosità campionaria.

Conclusioni

La relazione tra osteoporosi e parodontite e il ruolo dell'alimentazione nell'influenzare l'evoluzione di tali patologie sembra dover essere ancora profondamente esplorata. Tuttavia i risultati ottenuti sembrano consolidare l'idea che esista una relazione tra queste due patologie e che le abitudini alimentari abbiano un ruolo importante nella loro prevenzione. Le analisi prodotte potranno essere di sicuro interesse per lo sviluppo di ulteriori studi che riescano ad ampliare la numerosità campionaria in esame e a limitare i

fattori confondenti presenti a livello delle popolazioni di studio. E' infatti prevista una collaborazione tra il nostro gruppo di lavoro e la Società Italiana di Parodontologia e Implantologia (SidP) per esplorare ulteriormente gli spunti emersi da questo studio.

Bibliografia

- Adegboye ARA., C. L.-P. (2012). Intake of dairy products in relation to periodontitis in older danish adults. *Nutrients*, 4:1219-1229.
- Aimetti M, P. S. (2015). . Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in north Italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. *J Clin Periodontol*, 42(7):622-31.
- Arduino P.G., P. S. (2008). Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*, 37:107-21.
- Armitage GC., R. P. (2009). The biology, prevention, diagnosys and treatment of periodontal diseases: sicientific advances in the United States. *J. Am. Dent. Assoc.*, 140:36S-43S.
- Baumgartner S., I. T. (2009). The impact of the stone age diet on gingival conditions in the absence of oral hygiene. *J Periodontol*, 80:759-68.
- Bolster, M. B. (2021). *Osteoporosi, Manuale MSD versione per professionisti*. Tratto da Manuale MSD versione per professionisti: <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-del-tessuto-muscoloscheletrico-e-connettivo/osteoporosi/osteoporosi>
- Bostanci, N. e. (2007). Porphyromonas gingivalis antagonises Campylobacter rectus induced cytokine production by human monocytes. *Cytokine*, 39(2): p. 147-56.
- Brex MC., F. I. (1988). Stereological observations on long-term experimental gingivitis in man. *J Clin Periodontol*, 15:621-7.
- Brochut, P. e. (2005). Predictive value of clinical and microbiological parameters for the treatment outcome of scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, 32(7): p. 695-701.
- Chawla TN., G. I. (1951). Protein deprivation and the periodontal structures of the albino rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 4:578-602.
- Chen T., Y. W. (2010). The human oral microbiome database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*, 2010:baq013.
- Chen, C. e. (1989). Eikenella corrodens in the human oral cavity. *J Periodontol*, 60(11): p. 611-6.
- Dahlen, G. e. (1990). Biochemical and serological characterization of Bacteroides intermedius strains isolated from the deep periodontal pocket. *J Clin Microbiol*, 28(10): p. 2269-74.
- Dewhirst F.E., C. T. (2010). The uman oral microbiome. *J Bacteriol.*, 192(19):5002-17.

- Doungudomdacha, S. e. (2001). Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol*, 28(5): p. 437-45.
- Dzink, J. S. (1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 15(5): p. 316-23.
- Ellen, R. a. (2005). Spirochetes at the forefront of periodontal infections. *Periodontol*, 38: p. 13-32.
- Fine, D. (1994). Microbial identification and antibiotic sensitivity testing, an aid for patients refractory to periodontal therapy. A report of 3 cases. *J Clin Periodontol*, 21(2): p. 98-106.
- Fine, D. e. (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol*, 45(12): p. 3859-69.
- Fives-Taylor, P. e. (2000, 1999). Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol*, 20: p. 137-67.
- Giovannoni S.J., B. T. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplakton. *Nature*, 345:60-3.
- Grenier, D. a. (2006). Response of human macrophage-like cells to stimulation by *Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum* lipopolysaccharide. *Oral Microbiol Immunol*, 21(3): p. 190-6.
- Haffajee, A. a. (2000). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol*, 5: p. 78-111.
- Haffajee, A. e. (1988). Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 15(6): p. 390-8.
- Haffajee, A. J. (1988). Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. *J Clin Periodontol*, 15(4): p. 255-62.
- Holt, S. J. (2000, 2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol*, 38: p. 72-.
- Hytham N. Fageeh, H. I. (2021). Efficacy of vitamin C supplementation as an adjunct in the non-surgical management of periodontitis: a systematic review. *Syst Rev.*, 10: 5.
- Ihara, H. e. (2003). Detection of *Campylobacter rectus* in periodontitis sites by monoclonal antibodies. *J Periodontal Res*, 38(1): p. 64-72.
- Jobbins J., B. J. (1992). Oral carriage of yeasts, coliforms and staphylococci in patients with advanced malignant disease. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 21:305-8.
- Johnson, J. e. (2008). Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 79(12): p. 2305-12.
- Kassebaum NJ, B. T. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a . *J Dent Res*, 93(11):1045-53.
- Kassebaum NJ, S. A. (2017). *J Dent Res* , 96(4):380-7.

- Krzysciak W., J. A. (2016). The role of human oral microbiome in dental biofilm formation. In D. D., *Microbial biofilms*. Intech Open.
- Lin Zhang, X. L. (2018). Salivary matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a biomarker for periodontitis: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 97(3).
- Loe H., T. E. (1965). Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, 36:177-87.
- MacFarlane TW, M. D. (1974). Changes in the oral flora in Sjorgen's syndrome. *Journal of Clinical Pathology*, 27:416-9.
- Mandell, R. (1984). A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. *Infect Immun*, 45(3): p. 778-80.
- Mann V., R. S. (2003). Meta-analysis of COLIA1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone*.
- Melissa Kow, E. A. (2019). Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism and osteoporosis risk in White British men. *Annals of Human Biology*, 430-433.
- Miura, A. T. (2019). The Relationship between Vitamin C and Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*, 16(14): 2472.
- Mosca, A. e. (2007). Antimicrobial profiles of *Prevotella* spp. and *Fusobacterium nucleatum* isolated from periodontal infections in a selected area of southern Italy. *Int J Antimicrob Agents*, 30(6): p. 521-4.
- Najeeb S., Z. M. (2016). The role of nutrition in periodontal health: an update. *Nutrients*, 30;8(9).
- Nebel D., S. D. (2014). 1-25 dihydroxyvitamin D3 promotes osteogenic activity and downregulates proinflammatory cytokine expression in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 34:299-304.
- Network, E. D. (2021). <https://www.excellencedentalnetwork.com/parodontite/>. Tratto da <https://www.excellencedentalnetwork.com/>: <https://www.excellencedentalnetwork.com/parodontite/>
- Nielsen SJ., T.-F. M. (2016). Dietary fiber intake is inversely associated with periodontal disease among US adults. *J Nutr*, 146(12):2530-2536.
- Nonnenmacher, C. R. (2001). Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clin Microbiol Infect*, 7(4): p. 213-7.
- Olga Brzezińska, Z. Ł. (2020). Role of Vitamin C in Osteoporosis Development and Treatment-A Literature Review. *Nutrients*, 12(8):2394.
- Papapanou, P. e. (2002). Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. *Eur J Oral Sci*, 110(5): p. 345-52.
- Park JB., N. G. (2016). Obesity in relation to oral health behaviors: an analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Exp Ter Med*, 12(5): 3093-3100.

- Pihlstrom BL., M. B. (2005). Periodontal Disease. *Lancet*, 366:1809-1820.
- Poulin, R. C. (1999). The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol Today*, 15(12): p. 474-5.
- Rams, T. M. (1996). Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. *J Clin Periodontol*, 23(4): p. 346-54.
- Raspini M., C. R. (2021). Periodontitis and Italians (2016-2020): need for clinical . *Dental Cadmos*, 89(5):346-356.
- RE., S. (2009). Periodontal disease and nutrition: separating the evidence from current fads. *Periodontol 2000*, 50:78-89.
- Ready, D. e. (2008). Disease severity associated with presence in subgingival plaque of Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Tannerella forsythia, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 46(10): p. 3380-3.
- Rekha C., P. G. (2012). Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chem. Sci. Trans*, 1:303-310.
- Ritchie CS., K. D. (2003). Nutrition, inflammation and periodontal disease. *Nutrition*, 19:475.
- Rodenburg, J. e. (1990). Occurrence of Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol*, 17(6): p. 392-9.
- Rothberg J.M., L. J. (2008). The development and impact of 454 sequencing. *Nature*, 26:1117-24.
- Saito, A. e. (2008). Fusobacterium nucleatum enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54(3): p. 349-55.
- Sakamoto, M. M. (2005). Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res*, 40(3): p. 277-85.
- Salari, M. a. (2004). Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis. *J Oral Sci*, 46(3): p. 157-61.
- Simon J Stone 1, P. S. (2018). Exploring a temporal relationship between biofilm microbiota and inflammatory mediators during resolution of naturally occurring gingivitis. *Journal of Periodontology*, 627-636.
- Singh P., G. N. (2014). Salivary TNF-alpha: A potential marker of periodontal destruction. *J Indian Soc Periodontol*.
- SINU. (2014). *Livelli di assunzione di riferimento di nutrienti ed energia per una sana popolazione italiana*. Melzo (MI): SICS Editore Srl.
- Slots, J. a. (2000, 1999). Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment . *Periodontol*, 20: p. 82-121.

- Slots, J. D. (1990). Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides intermedius in human periodontitis: age relationship and mutual association. *J Clin Periodontol*, p. 659-62.
- Slots, J. e. (1986). The occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*, 13(6): p. 570-7.
- Socransky, S. e. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2): p. 134-44.
- Stahl SS., S. H. (1955). The effect of protein deprivation upon the oral tissues of the rat and particularly upon periodontal structures under irritation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 8: 760-768.
- Sullivan A, E. C. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases*, 1:101-14.
- Tanner, A. a. (2006). Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol*, 42: p. 88-113.
- Tobon-Aroyave SI., I-G. D.-T. (2017). Association study of Vitamin D receptor (VDR) - Related genetic polymorphisms and their haplotypes with chronic Periodontitis in colombian population. *J Clin Diagn Res*.
- Torresyap, G. e. (2003). Relationship between periodontal pocket sulfide levels and subgingival species. *J Clin Periodontol*, 30(11): p. 1003-10.
- Trim R.D., S. M. (2011). Use of PCR to detect Entamoeba gingivalis in diseased gingival pockets and demonstrate its absence in healthy gingival sites. *Parasitol Res*, 109:857-64.
- van der Putten GJ., V. J. (2009). Association of some specific nutrient deficiencies with periodontal disease in elderly people: a systematic literature review. *Nutrition*, 25:717-722.
- van der Reijden, W. e. (2008). Java project on periodontal diseases: serotype distribution of Aggregatibacter actinomycetemcomitans and serotype dynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol*, 35(6): p. 487-92.
- Varela-Lopez A., F. G. (2016). Role of lipids in the onset, progression and treatment of periodontal disease. A systematic review of studies in humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 17; 1-13.
- Varela-Lopez A., G. F. (2016). A systematic review on the implication of minerals in the onset, severity and treatment of periodontal disease. *Molecules*, 21(9).
- Vollard EJ, C. H. (1994). Colonization resistance. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 38:409-14.
- Wantland W.W., W. E. (1958). Studies on human mouth protozoa. *J Dent Res*, 37:949-50.
- Wescombe P.A., H. N. (2009). Streptococcal bacteriocins and the case for Streptococcus salivarius as model oral probiotics. *Future microbiology*, 4:819-35.
- William D., L. M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*.

- Yokoyama, M. e. (2005). Effect of female sex hormones on *Campylobacter rectus* and human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*, 20(4): p. 239-43.
- Yokoyama, M. e. (2008). Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. *Oral Microbiol Immunol*, 23(1): p. 55-9.
- Zambon, J. H. (1990). Studies of the subgingival microflora in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Periodontol*, 61(11): p. 699-704.
- Zilm, P. a. (2007). Co-adhesion and biofilm formation by *Fusobacterium nucleatum* in response to growth . *Anaerobe*, 13(3-4): p. 146-52.