

**IMMUNOFLOGOSI E DECLINO COGNITIVO NELL'ANZIANO.
CONTRIBUTO DELLE INFEZIONI BATTERICHE CRONICHE: IL
MODELLO UMANO DELLA PARODONTITE.**

SOMMARIO

INTRODUZIONE	
LA MALATTIA PARODONTALE	pag. 2
LE PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE	pag. 10
IPOSTESI DI ASSOCIAZIONE TRA MALATTIA PARODONTALE E MALATTIE NEURODEGENERATIVE	
Malattia parodontale e Patologie neurodegenerative: aspetti comuni	pag. 19
EVIDENZE DI ASSOCIAZIONE TRA MALATTIA PARODONTALE E MALATTIE NEURODEGENERATIVE	
Studi epidemiologici	pag. 26
Studi clinici	pag. 28
STUDIO SPERIMENTALE	pag. 42
Introduzione	pag. 42
Materiali e metodi	pag. 43
Analisi biostatistica	pag. 44
Risultati	pag. 45
DISCUSSIONE	pag. 47
BIBLIOGRAFIA	pag. 50
APPENDICE	pag. 60

INTRODUZIONE

LA MALATTIA PARODONTALE

Per malattia parodontale si intende un insieme di patologie croniche a patogenesi infiammatoria ed eziologia batterica, che determina la perdita progressiva dei tessuti parodontali. Questi ultimi sono costituiti da gengiva, legamento parodontale, cemento radicolare ed osso e costituiscono l'apparato anatomico-funzionale che garantisce il sostegno del dente. Le patologie parodontali hanno una elevata prevalenza nella popolazione e sono una delle principali cause di perdita degli elementi dentari e delle conseguenze in termini di funzioni orali che da ciò deriva[1].

L'eziologia della malattia parodontale, come ormai dimostrato da innumerevoli studi, è di tipo batterico; in particolare, l'insieme dei microorganismi in essa coinvolti si accumulano sulla superficie dura degli elementi dentari ed all'interno dei difetti parodontali, formando una biopellicola complessa quale la placca batterica[2].

La placca batterica, infatti, è un conglomerato di batteri, cellule epiteliali e polimorfonucleati, tenuti insieme da una matrice organica intercellulare costituita da carboidrati e proteine; essa è fortemente aderente alle superfici dure dei denti e la sua mineralizzazione porta alla formazione del tartaro. La complessità del biofilm della

placca risiede nella sua composizione microbica, ma anche nelle interazioni che al suo interno si realizzano sia tra i microbi stessi, che tra i microbi e l'habitat; infatti, le specie batteriche presenti nella placca batterica, sono più di 700 [3]e presentano diversi gradi di patogenicità nei confronti dell'ospite. Allo stesso modo all'interno del cavo orale possono realizzarsi diverse condizioni "microambientali" che possono essere influenzate dalla composizione microbica e, a loro volta, influenzare quest'ultima.

L'accumulo di placca comporta modificazioni qualitative della componente microbica con un incremento assoluto e relativo del numero e della proporzione di specie gram negative anaerobie, la cui valenza, in termini di patogenicità per la parodontite, risulta essere più significativa. Infatti, tra queste ve ne sono alcune che sono considerate patogeni parodontali specifici: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticula*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, [4] etc. I suddetti patogeni parodontali presentano diverse caratteristiche di patogenicità e di virulenza, fondamentali nell'ambito della patogenesi della malattia parodontale. Infatti, essi presentano:

- la capacità di adesione alle superfici, fondamentale per la colonizzazione di un sito parodontale, espressa grazie all'uso di adesine come fimbrie e fibrille, che hanno come ligandi alcuni componenti tissutali dell'ospite, quali: i residui galattosilici, le proteine ricche di prolina o il collagene di tipo I e IV. L'adesione batterica può avvenire sulla superficie dell'elemento dentario, sull'epitelio della tasca o del solco o ancora su altre specie batteriche già precedentemente adese su tali superfici[5];
- la capacità di produrre sostanze citotossiche nei confronti di altri batteri, fra questi: batteriocine e fattori che inibiscono l'adesione e moltiplicazione di altre specie. Proprio queste sono armi con cui i batteri riescono a competere con gli altri microorganismi per l'approvvigionamento delle risorse nutritive presenti nel solco gengivale o nel difetto parodontale;
- la capacità di invadere le cellule dei tessuti parodontali e gli strati più profondi, tramite fattori di invasività che garantiscono prima l'adesione e poi l'ingresso dei batteri in questione. L'invasione batterica viene messa in atto attraverso mezzi fisici di mobilità (quali i flagelli) presenti in alcune specie (*Spirochete*, *Selemonas*, *Campylobacter*) e la produzione e diffusione di enzimi, quali

collagenasi (che hanno un'azione lesiva diretta sui tessuti parodontali). Questi sono capaci di digerire il collagene, l'elastina, la fibronectina e le varie altre componenti della matrice intercellulare, distruggendo così le barriere fisiche che potrebbero limitare la diffusione batterica;

- la produzione di fattori citotossici, quali la leucotossina, in grado di uccidere i leucociti (polimorfonucleati, monociti, linfociti B e T) e di inibire la differenziazione delle cellule immunocompetenti[6];
- la produzione di molecole che danneggiano direttamente le cellule dei tessuti (H₂S, NH₄);
- la produzione di sostanze che inducono le cellule a rilasciare costituenti biologicamente attivi che stimolano la produzione di citochine pro-infiammatorie che, insieme alla liberazione di proteasi, endopeptidasi ed esopeptodasi, hanno la capacità di degradare la matrice intercellulare;
- la produzione di tossine, quale la nota endotossina tipica dei batteri gram negativi nota come LPS (lipolisaccaride), in grado di stimolare la risposta infiammatoria e immunitaria, interferendo sul sistema di coagulazione e sul

sistema del complemento, portando ad un'alterazione dell'emostasi e alla formazione di vari peptidi pro-infiammatori.

In seguito all'accumulo di placca e di prodotti batterici, l'ospite reagisce attraverso una risposta infiammatoria e immunitaria, in grado, in teoria, di rimuovere la noxa patogena: purtroppo tali reazioni non sempre sono in grado di rimuovere l'agente eziologico, ma spesso possono esse stesse cronicizzarsi e, attraverso il reclutamento in loco di diverse popolazioni cellulari (come polimorfonucleati, macrofagi, linfociti), la produzione di citochine pro-infiammatorie, determinare un rimodellamento tissutale e successivamente una distruzione parodontale.

Il danno tissutale, infatti, è per la maggior parte causato dall'azione delle proteasi dell'ospite, liberate dalle cellule immunocompetenti. A tal riguardo è sicuramente da citare il ruolo svolto dalle metalloproteinasi e specificatamente dalla collagenasi dei neutrofili che hanno il compito di degradare il collagene del connettivo per creare lo spazio necessario all'infiltrato infiammatorio.

Un altro sistema difensivo è messo in atto dalla risposta immunologica, tramite la risposta umorale specifica (liberazione di immunoglobuline) e la risposta cellulo-mediata (linfociti t citotossici e linfociti natural killer).

La reazione infiammatoria nelle fasi iniziali interessa soltanto i tessuti superficiali, ma in seguito può estendersi ai tessuti parodontali profondi. Da una situazione iniziale subclinica (con aumento del fluido crevicolare e dei granulociti) si passa alla gengivite (con un infiltrato linfoplasmacellulare), manifestando i classici segni dell'infiammazione e, infine, alla parodontite, con la distruzione dei tessuti parodontali.

In corso di gengivite l'organismo comunque riesce a far fronte ai microorganismi attraverso le risposte innate e adattative, impedendo la distruzione tissutale irreversibile.

In corso di parodontite l'equilibrio esistente tra sistema di difesa dell'organismo e microbi sottogengivali, viene alterato, portando ad un'infiammazione incontrollata caratterizzata, all'interno dei tessuti parodontali, dalla produzione di alti livelli di mediatori dell'infiammazione, quali IL-1, IL-6, IL-17 e TNF- α e bassi livelli di IL-10[7, 8].

Queste molecole agiscono amplificando la reazione infiammatoria, attivando i meccanismi responsabili della distruzione tissutale e attivando le metalloproteinasi con

conseguente inibizione della sintesi del collagene. Inoltre i linfociti B e T sono stimolati a rilasciare una serie di citochine, che portano all'attivazione di macrofagi ed osteoclasti: questi contribuiscono al riassorbimento e alla distruzione dei tessuti di sostegno parodontali. L'accumulo di batteri e dei loro fattori di virulenza in sede sub-gengivale che si riscontra nella parodontite, nonché l'accumulo dei fattori infiammatori ed immunologici da essi esplicitati, sono potenzialmente in grado di determinare effetti "sistemici" dal momento in cui i batteri, i loro prodotti ed i fattori infiammatori liberati in loco, sono in grado di guadagnare il circolo sistemico. Infatti, nei pazienti parodontopatici la superficie dell'area infetta può avere le dimensioni del palmo di una mano; inoltre, i batteri sottogengivali formano biopellicole altamente organizzate che rappresentano una carica batterica consistente e continua e una fonte costante di LPS e di batteri gram negativi. Le citochine pro-infiammatorie, come il TNF- α , IL-1 e INF- γ , e il PGE₂, possono raggiungere concentrazioni elevate nei tessuti dei difetti parodontali, costituendo un serbatoio attraverso cui tali mediatori si riversano continuamente in circolo. Per tal motivo la malattia parodontale rappresenta un fattore di rischio per patologie quali: le malattie cardiovascolari[9], le infezioni respiratorie[10], il diabete, le patologie renali, come confermerebbero innumerevoli studi effettuati.

Essendo la causa eziologica conosciuta e note le correlazioni esistenti con le patologie sistemiche, intervenire nella rimozione della causa porterebbe, oltre ad un miglioramento della salute orale, anche alla riduzione dei fattori di rischio per tali patologie.

LE PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE

Le patologie neurodegenerative sono un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate da una lenta e progressiva perdita di una o più funzioni del sistema nervoso. Le più note sono la malattia di Alzheimer (AD), il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica e la corea di Huntington. Un segno ricorrente di tali patologie è la demenza, definita come *“diminuzione rilevante o perdita totale delle funzioni intellettive, che s’instaura gradualmente e progressivamente, per cause diverse in soggetti precedentemente normali”*. In funzione dell’eziologia, le patologie neurodegenerative si possono classificare in: demenze degenerative primarie o idiopatiche e demenze in corso di altre patologie neurodegenerative.

L’impatto della demenza sulla popolazione in termini epidemiologici si traduce in percentuali che possono arrivare fino al 50% nei pazienti in età avanzata: la metà di tale casistica è ascrivibile alla malattia di Alzheimer. L’incidenza di tale patologia tende ad aumentare in maniera progressiva a partire dai 65 anni, fino ad arrivare ad una prevalenza nella popolazione del 4% a 75 anni. Al di sopra di tale età, paradossalmente, i nuovi casi di malattia di Alzheimer tendono a diminuire progressivamente. Dal momento che la prospettiva di vita si è notevolmente allungata negli ultimi decenni, si

può comprendere come una malattia che colpisce prevalentemente i soggetti di età compresa tra i 65 e i 75 anni, costituisca un problema di salute pubblica di considerevole rilevanza.

Nell'ambito del presente studio, l'attenzione sarà focalizzata sulla malattia di Alzheimer, poiché essa costituisce la preponderanza dei casi di demenza neurodegenerativa primaria. Tale patologia è caratterizzata da un quadro sintomatologico classico, costituito da un iniziale deficit amnesico con afasia a cui segue aprassia associata a disturbi visuospatiali e visuoperceptivi, per poi giungere, in ultimo stadio, a deliri e allucinazioni. Tale quadro sintomatologico è correlato ad alterazioni di natura istopatologica che interessano la corteccia cerebrale, ossia: i grovigli neuro fibrillari, le placche senili e le placche amiloidee. I fattori di rischio certamente implicati nell'insorgenza della malattia di Alzheimer sono principalmente due: l'età e la familiarità. Per quanto concerne la familiarità, mutazioni patogenetiche dell'APP (proteina precursore dell'Amiloide) e della presenilina determinano un rischio pari al 50% nei soggetti con familiarità.

Ci sono varie ipotesi a riguardo dell'eziopatogenesi. In particolare l'ipotesi classica accertata (della cascata amiloide) prevede che le alterazioni istopatologiche delle

placche senili, dei grovigli neurofibrillari e la perdita neuronale siano tutte secondarie alla deposizione di sostanza amiloide. I modelli previsti danno come probabili meccanismi, un alterato metabolismo dell'APP, che dà luogo ad un'aumentata deposizione della β -amiloide, una glicoproteina. Ciò è dovuto ad un aumento della produzione dell'APP o ad una produzione quantitativamente normale, ma con una catena C- terminale più allungata, che favorirebbe la deposizione e la formazione di fibrille. Altre mutazioni implicate nell'eziopatogenesi possono essere ricondotte a mutazioni di proteine transmembrane codificate dai geni della presenilina. Da ricordare, naturalmente, che la deposizione di β -amiloide è neurotossica, perchè provoca, presumibilmente, un'alterazione dell'omeostasi del calcio e la produzione di radicali liberi.

Nonostante sia ritenuto che l'amiloide giochi un ruolo fondamentale nell'eziopatogenesi, ancora sono oscuri molti aspetti sulla morte cellulare indotta da quest'ultima. Tali studi sono stati effettuati su forme familiari di malattia di Alzheimer, in cui il ruolo genetico può essere più facilmente individuato. Nelle forme classiche della malattia di Alzheimer il fattore scatenante della deposizione di amiloide è ancora da identificare.

Accanto alla teoria classica, bisogna prendere in esame anche la teoria secondo cui a scatenare la precipitazione della β -amiloide siano i processi infiammatori[11-13]. Questa precipitazione della β -amiloide è stata messa in associazione sia a quadri infiammatori sub-acuti locali (SNC), sia a infiammazioni periferiche, sostenute soprattutto da batteri gram negativi, quali, per esempio, quelli che rappresentano gli agenti eziologici delle malattie parodontali. Alla base dell'ipotesi infiammatoria sull'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer vi è la presenza di un processo infiammatorio cronico autosostenuto a livello del sistema nervoso centrale che induce la neuro-degenerazione. I fattori che scatenano e sostengono l'infiammazione in corso di malattia di Alzheimer sono sconosciuti, ma alcuni indizi ci provengono dallo studio delle placche senili e dei grovigli neuro fibrillari. Infatti, recentemente sono stati scoperti alcuni fattori, come $A\beta_{42}$ (beta-amiloide) all'interno delle placche e P-Tau [14-16]trovato nei grovigli neurofibrillari, che, insieme alle componenti cellulari dei neuroni andati incontro a degenerazione apoptotica, sarebbero in grado di stimolare la produzione di citochine pro-infiammatorie, quali: il tumor necrosis factor- α (TNF- α), l'interleuchina-1 β (IL-1 β), l'interleuchina-6 (IL-6) e la produzione della PCR (proteina C reattiva)[17-19]. Questi fattori, non solo sostengono il quadro infiammatorio, ma sono

anche capaci di indurre a loro volta la neurodegenerazione. Inoltre tutti i succitati elementi, insieme alle citochine pro-infiammatorie, sono in grado di attivare la cascata del complemento, amplificando tutte quelle condizioni che predispongono alla neurodegenerazione.

Conferme di queste ipotesi provengono da studi in vitro, clinici ed epidemiologici.

Studi effettuati in vitro hanno dato alcune conferme: infatti si è visto che TNF- α , IL-1 β , IL-6 stimolano la sintesi della A β 42 e la fosforilazione della P-tau, che, a loro volta, inducono il rilascio di citochine proinfiammatorie .

Alcuni studi clinici hanno riscontrato un aumento nel siero di PCR[20, 21] (che ricordiamo essere una proteina della fase acuta dell'inflammatione che aumenta in corso di quadri infiammatori sistemici) e di altri markers infiammatori in pazienti che, successivamente, hanno sviluppato la malattia di Alzheimer. Altri studi hanno appurato un aumento delle interleuchine IL-6, IL-1 β e il TNF- α [22] associato ad una maggiore incidenza della perdita delle funzioni cognitive in soggetti di età avanzata.

In effetti il ruolo delle citochine pro-infiammatorie, come fattori predittivi per lo sviluppo della malattia di Alzheimer, trova pareri discordanti in letteratura[23]: tali valori aumentano anche in relazione ad altre patologie infiammatorie sistemiche. Quindi

vi è associazione ma non vi è sicuramente specificità nella predizione dell'insorgenza della malattia di Alzheimer.

L'ipotesi infiammatoria trova sostegno nello studio degli antiinfiammatori non steroidei, quali i FANS[24]. Quei pazienti a cui sono stati somministrati i FANS ai primi sintomi di malattia di Alzheimer, hanno presentato un ritardo nell'insorgenza della demenza. Altri studi, invece, hanno dimostrato una contraddizione: la produzione da parte della glia neuronale di A β 42, soprattutto dopo l'assunzione di indometacina. Tale contraddizione, però, potrebbe essere solo apparente dal momento che i FANS sono farmaci che agiscono su diversi meccanismi: da un lato con l'inibizione delle ciclo ossigenasi 2 abbiamo un'induzione alla produzione di A β 42, dall'altro abbiamo una riduzione della liberazione delle citochine pro-infiammatorie, responsabili, a loro volta, della produzione di A β 42.

Studi genetici effettuati sulle citochine (e specificatamente sull'IL -1 α) hanno evidenziato un notevole polimorfismo genetico di quest'ultimo e hanno riscontrato che, in soggetti che esprimono il gene per IL1- α -889[25], presentano un rischio 10 volte superiore di sviluppare malattia di Alzheimer. Va osservato, inoltre, che la presenza di tale gene è associato anche ad un aumento dello sviluppo della malattia parodontale.

Questo studio ci può dare anche un'indicazione sulla presenza di un ulteriore collegamento tra la neuro degenerazione associata alla malattia di Alzheimer e la malattia parodontale.

Le molecole pro-infiammatorie come TNF- α , IL-1 e IL-6 hanno un accesso limitato al SNC essendo di grossa dimensione. Comunque esistono prove che tali molecole raggiungono o influenzano il SNC attraverso il circolo sistemico o percorsi neuronali[26, 27]. Le citochine pro-infiammatorie per poter interagire col cervello devono :

1. Superare la barriera ematoencefalica attraverso le seguenti modalità:
modificandone la permeabilità; legandosi in aree prive di barriera, come gli organi circumventricolari[28]; attraversando in punti con la presenza di capillari fenestrati, usando specifici trasportatori[29].
2. Attivare le cellule endoteliali e perivascolari presenti nel cervello, inducendo la produzione di molecole di segnalazione, quali l'ossido nitrico (NO), prostanoidei o altre citochine[30, 31], che a loro volta stimolano le cellule della glia neuronale. Naturalmente se il processo di neurodegenerazione è già in fase attiva queste citochine rappresentano uno stimolo aggiuntivo, amplificando il quadro

infiammatorio, favorendo la formazione delle alterazioni anatomico-patologiche alla base della malattia di Alzheimer.

3. Interagire con il SNC attraverso i percorsi neuronali[32]. Interferendo con le fibre dei nervi periferici, inducendo quest'ultimi a stimolare la produzione di citochine pro infiammatorie o attraversando tali percorsi nei punti di afferenza al SNC. Questo porta anche a considerare l'evenienza che un quadro infiammatorio periferico possa indurre un aumento delle citochine a livello del SNC, senza che vi sia un aumento sistemico di queste molecole.
4. Attivare le cellule infiammatorie (linfociti B e T e macrofagi) in modo tale da far ottenere loro un accesso al cervello, contribuendo successivamente al pool infiammatorio cerebrale.

I prodotti batterici possono innalzare i livelli delle citochine cerebrali. Un ruolo di primo piano viene svolto dal LPS batterica che, come discusso precedentemente, è in grado di attivare la risposta immunitaria innata e di stimolare l'espressione sulla membrana cellulare di CD-14[33], che, fra l'altro, può essere a sua volta attivata dalla β miloida. In oltre il LPS ha la capacità di aumentare la permeabilità della barriera ematoencefalica, favorendo il passaggio di molecole, cellule e possibili batteri nel

cervello. A conferma di questo meccanismo vi è uno studio effettuato sui topi transgenici APP_{swe}, ai quali è stato somministrato LPS, portando un aumento del precursore della β amiloide[34]. Nella patogenesi malattia di Alzheimer sono state coinvolte diverse specie batteriche, tra cui la *Clamydia Pneumoniae*[35], l'*Helicobacter pylori* e le spirochete. Tali batteri sono stati riscontrati in sezioni anatomiche del SNC, ma il loro ruolo come agenti eziologici primari nell'insorgenza malattia di Alzheimer è ancora in discussione. Anche se sempre di più ci giungono conferme sulla loro capacità di invadere il SNC e di interferire con i meccanismi alla base della malattia.

Viste le similitudini eziopatogenetiche tra la malattia parodontale e le malattie neurodegenerative sopra discusse, con il presente studio ci si propone di analizzare le attuali evidenze scientifiche, al fine di valutare se la malattia parodontale possa costituire un potenziale fattore di rischio per le patologie neurodegenerative.

IPOTESI DI ASSOCIAZIONE TRA MALATTIA PARODONTALE E

MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Malattia parodontale e Patologie neurodegenerative: aspetti comuni.

Malattia parodontale e Patologie neurodegenerative presentano un'eziopatogenesi differente, però sempre di più si individuano fattori di rischio comuni che ne possono influenzare l'insorgenza, la gravità e la progressione[36].

I meccanismi coinvolti nella patogenesi della malattia di Alzheimer non sono del tutto chiari, tuttavia si crede che l'infiammazione debba avere un ruolo importante[37].

Pertanto tutti quei quadri infiammatori che contribuiscono ad aumentare lo stato infiammatorio cerebrale, possono potenzialmente favorire la progressione della malattia.

Tra questi quadri abbiamo la malattia parodontale, che espone l'organismo alla presenza costante di un quadro infiammatorio associato a batteri che colonizzano il parodonto.

L'ipotesi avanzata è che la malattia parodontale possa in qualche modo partecipare alla storia naturale della malattia di Alzheimer.

In particolare, i meccanismi con cui le parodontiti potrebbero essere correlate ad essa sono principalmente due: infiammatori e batterici.

Il meccanismo infiammatorio vede coinvolta la produzione delle molecole infiammatorie, causate dalle parodontiti, nell'incrementare l'infiammazione cerebrale. Infatti, l'interazione tra batteri parodontali e organismo comporta una produzione locale di molecole infiammatorie, tra le quali: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e la PCR. Nelle forme più gravi di malattia parodontale, le citochine pro-infiammatorie possono indurre un'infiammazione sistemica, con la possibilità di raggiungere il sistema nervoso centrale attraverso la circolazione sistemica. Tali molecole prodotte a livello dei tessuti parodontali, possono, inoltre, stimolare a livello del cavo orale le fibre nervose del trigemino, facendo aumentare ulteriormente, come descritto in precedenza, le citochine cerebrali. L'azione delle citochine si esplica attraverso un effetto sinergico nei confronti della glia neuronale, che risulta già attivata, scatenando, così, una reazione amplificata, favorendo la progressione della malattia di Alzheimer. Bisogna ancora dimostrare se il quadro infiammatorio periferico sia coinvolto o nell'insorgenza della malattia o nella sua progressione o di entrambe. Tutti gli studi finora condotti non danno indicazione

certe se le infiammazioni periferiche siano coinvolte primariamente o nella genesi o nella progressione malattia di Alzheimer o in entrambi.

L'altro meccanismo con cui la parodontite potrebbe contribuire all'infiammazione cerebrale, è quello batterico.

Si presume che i batteri coinvolti nella patogenesi della malattia parodontale, potrebbero essere coinvolti anche nella patogenesi della malattia di Alzheimer. Le specie che presentano una maggiore associazione per entrambe le patologie sono le seguenti: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*[38] e il *F. nucleatum*.

Questi batteri hanno la caratteristica di invadere il SNC, contribuendo all'insorgenza della patologia neurodegenerativa, interagendo con meccanismi patologici preesistenti. In studi effettuati si è riscontrata la presenza di alcune specie di *Treponema* a livello del cervello, sia in soggetti animali vivi sia in sezioni anatomiche di cervelli di cavie[39].

Tale riscontro non ci deve sorprendere perché, come sappiamo, il *Treponema denticula* fa parte della stessa classe del *Treponema pallidum* (agente eziologico della sifilide) che ha già la capacità di invadere il SNC e di provocare la deposizione di amiloide. Inoltre la presenza dei suddetti batteri negli ascessi cerebrali, dà prova della loro capacità di invadere il cervello.

I batteri parodontali con i loro fattori di virulenza (tra cui LPS), raggiunto il SNC, sono in grado di indurre il rilascio di citochine. Anche a tale riguardo studi hanno confermato tale ipotesi: infatti, si è visto un peggioramento della malattia in topi che presentavano un quadro di encefalite mielinizzante dopo aver iniettato batteri (*Porphyromonas gingivalis*) inattivati dal calore[40]. L'agente principale nello stimolare le cellule della glia neuronale, come ampiamente descritto in precedenza, è il LPS, soprattutto quello associato al *Porphyromonas gingivalis*. Tale glico-proteina ha la capacità di stimolare il rilascio, da parte della glia neuronale, sia di ossido di azoto che di prostaglandina E2, come si è evidenziato in studi sui ratti[41]. Tale stimolazione è mediata grazie alla presenza dei recettori CD14 e TLR-2 e 4[42]. In un esperimento effettuato sui ratti, che consisteva nell'iniettare il *C. rectus* in sede sottocutanea, ha evidenziato nella prole delle suddette cavie la presenza: di alterazioni anatomiche macroscopiche nella regione dell'ippocampo; di alterazioni citoplasmatiche quali la presenza di vacuoli e di detriti cellulari; di un quantitativo doppio di TNF- α e di interferone γ [43].

Non si è ancora a conoscenza dei meccanismi grazie ai quali i batteri parodontali hanno accesso al SNC, però si può ipotizzare un modello già descritto per altri batteri,

che consiste nel raggiungere il cervello attraverso la circolazione sistemica. I batteri del cavo orale possono raggiungere la circolazione, dando quindi batteremia, in seguito a eventi traumatici o a manipolazioni odontoiatriche.

I batteri, inoltre, possono raggiungere il cervello anche attraverso i nervi periferici, seguendone il decorso[44]. Infatti si è riscontrata in alcuni studi la presenza di spirochete orali a livello dei gangli del trigemino, dando la dimostrazione che tali agenti hanno la capacità di risalire i nervi periferici, invadendo il SNC. Naturalmente la presenza di questi batteri a livello delle fibre nervose periferiche o della circolazione sistemica, non implica che quest'ultimi abbiano automaticamente l'accesso al cervello. Pertanto, si ipotizza la presenza di cofattori quali citochine pro-infiammatorie, altre infezioni e l'età del paziente che contribuiscono a far giungere i patogeni parodontali al livello del cervello[45].

A tuttora prove cliniche dirette di un legame tra la malattia parodontale e la malattia di Alzheimer non sono ancora state acquisite. Tuttavia, esistono evidenze indirette. Premesso che la caduta di un elemento dentario può essere ricondotta a molteplici cause, tra cui la parodontite, si è notato che la perdita dei denti presenta un'associazione sia con la demenza sia con la malattia di Alzheimer[46]. Queste evidenze ci provengono

da studi effettuati su due differenti campioni di popolazione (studi inglesi e coreani)[47, 48] che hanno riferito un'incidenza maggiore della perdita degli elementi dentari associata al decadimento cognitivo. Uno studio svedese[49] ha dimostrato in gemelli omozigoti, l'esistenza di un forte legame tra la perdita dei denti e malattia di Alzheimer. I risultati più rimarchevoli, però, sono quelli che ci ha fornito il noto *Nun Study* (su cui ci soffermeremo più diffusamente più avanti). Essi hanno evidenziato un aumento del rischio di sviluppare malattia di Alzheimer in soggetti che presentavano un numero ridotto di elementi dentari fino a 6,4 rispetto alla popolazione generale[50]. Questo aumento del rischio si presenta in quei soggetti che non presentano l'allele APOE 4ε. A tal proposito uno studio mette in relazione l'assenza di tale allele con la presenza nel siero di IgG nei confronti di alcuni batteri parodontali: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e il *F. nucleatum*. Gli autori del *Nun Study* hanno ipotizzato che l'assenza dell'allele APOE 4ε possa rappresentare un fattore di rischio per la malattia di Alzheimer. Nonostante ciò, tale aumento di incidenza può essere ricondotto a una maggiore suscettibilità dei soggetti che non presentano l'allele APOE 4ε alla malattia parodontale e che sia poi quest'ultima a rappresentare il vero fattore di rischio. Si è ipotizzato che la presenza di questo allele possa influenzare positivamente o

negativamente la risposta infiammatoria all'infezione. Quindi: i non portatori hanno una migliore risposta immunitaria ai batteri parodontali rispetto ai portatori ed è proprio questa risposta ad essere, presumibilmente, la causa di una più alta incidenza della demenza in questo campione. Studi clinici hanno dimostrato l'associazione esistente tra perdita dei denti e la demenza. Naturalmente la perdita di elementi dentari può essere ricondotta non soltanto alla malattia parodontale, ma anche a carie e a patologie endodontiche e non è da escludere che in futuro possano esserci prove che associno queste ultime condizioni alla patogenesi malattia di Alzheimer.

EVIDENZE DI ASSOCIAZIONE TRA MALATTIA PARODONTALE E

MALATTIE NEURODEGENERATIVE

STUDI EPIDEMIOLOGICI

Analisi dello studio NHANES-III (The Third National Health and Nutrition Examination Survey)[51]

Quando si parla di teorie che pongono in relazione le malattie parodontali con quelle neurodegenerative, è doveroso almeno citare lo studio condotto da un gruppo di ricercatori sulla base dei dati forniti dal NHANES-III: *The Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Quest'ultimo è uno studio trasversale condotto negli USA, tra il 1988 e il 1994 dal *National Center for Health Statistics*, reclutando 33994 persone.

Lo studio ha messo in relazione la presenza di un marker sierologico di un agente patogeno parodontale, con scarsi risultati ottenuti nel test cognitivo di un campione rappresentativo a livello nazionale. Le conclusioni dei ricercatori hanno portato ad evidenziare che, individui che presentavano alti livelli di IgG nei confronti del *P.gingivalis*, presentano una maggiore possibilità di andare incontro a compromissione

della memoria e delle capacità cognitive. Identificando una correlazione statisticamente significativa tra IgG e *P. gingivalis* e demenza. Lo stesso studio è stato condotto nei confronti del *A. actinomicetemcomitans* non trovando nessuna correlazione.

STUDI CLINICI

Nun Study

Esistono alcuni studi che hanno dimostrato la correlazione tra malattie neurodegenerative e precarie condizioni di salute orale. Tuttavia sono pochi gli studiosi che hanno tentato di mettere in relazione le malattie dento-parodontali con il susseguente rischio di sviluppare deficit cognitivi e la demenza. Tale associazione, come abbiamo evidenziato nei capitoli precedenti, è biologicamente plausibile. Infatti i potenziali meccanismi alla base di tale relazione, sono i processi infiammatori che si generano in corso di malattia parodontale e la disseminazione di batteri gram negativi dal cavo orale, che hanno la capacità di raggiungere il cervello, come dimostrato da Riviere e coll. analizzando sezioni di tessuto cerebrale e individuando antigeni di treponemi in pazienti con la malattia di Alzheimer.

Il *Nun Study* è uno studio longitudinale volto ad analizzare tutti quei fattori correlati con l'insorgenza, l'evoluzione e la progressione della malattia di Alzheimer. I partecipanti all'indagine sono delle suore cattolico-romane, membri della congregazione internazionale della School Sisters of Notre Dame. Ad un primo esame, condotto tra il 1991 e il 1993, le 678 suore che hanno accettato di partecipare a tutte le fasi dello studio

(quindi con esame annuale delle funzioni cognitive e donazione dei tessuti cerebrali alla loro morte) avevano un'età compresa tra i 75 e i 102 anni, con una media di 83 anni. Lo studio condotto da Pamela Sparks Stein, Mark Desrosiers, Sara Jane Donegan, Juan F. Yepes e Richard J. Kryscio e pubblicato nel *Journal Of the American Dental Association*, ha preso in esame solo quei soggetti che facevano parte della provincia di Melwaukee, perché era la sola provincia nella quale vi era una clinica odontoiatrica in loco e che disponeva a tempo pieno di uno staff dentistico. Uno degli autori di tale studio (S. J. Donegan), è stato il dentista di queste suore fin dal 1964. In virtù di ciò, c'è stata la possibilità di combinare 40 anni di studi longitudinali con 12 anni di riscontri effettuati dal *Nun Study*, su reperti anatomici e su valutazioni delle funzioni cognitive delle suddette suore. La demenza associata a patologie neurodegenerative, è connessa a fattori e a meccanismi che non possono essere casuali. Infatti sono stati scoperti, oltre ai classici fattori di rischio quali l'età e la familiarità, anche polimorfismi di geni che sono implicati nell'insorgenza delle forme tardive malattia di Alzheimer, quali l'allele dell'APOE 4. Il campione preso in esame era costituito da 144 suore ed erano state esclusi quei casi ritenuti inadeguati allo studio o a causa di una pregressa patologia psichiatrica, risalente all'età giovanile, o a causa dell'impossibilità di determinare la

presenza o l'assenza dell'allele APOE 4. Tale campione risulta essere rappresentativo rispetto alla popolazione del *Nun Study* (678 suore). Infatti l'età media, il titolo di studio e la presenza dell'allele APOE 4, ha percentuali simili al totale dei partecipanti al *Nun Study*. Nello specifico:

Campione

- L'età media è di 84 anni al primo esame cognitivo;
- Presenza dell'allele APOE 4 nel 22% dei casi;
- L'85% in possesso di laurea e l'88% aveva svolto attività di insegnamento.

Popolazione totale del *Nun Study*

- L'età media è di 83 anni al primo esame cognitivo;
- Presenza dell'allele APOE 4 nel 23% dei casi;
- L'84% in possesso di laurea e l'90% aveva svolto attività di insegnamento.

Gli odontoiatri avevano registrato tutti i dati relativi alla storia clinica delle suore prese in esame, con materiale documentario riguardante patologie sistemiche esistenti e lo stato di salute dentale. In alcuni casi sono state archiviate anche radiografie, annotando anche la causa delle eventuali estrazioni. Da questi dati sono stati ricavati 3 gruppi,

escludendo gli edentuli: nel primo gruppo abbiamo soggetti che presentano un numero di denti compreso tra 1 e 9; nel secondo da 10 a 16; nel terzo da 17 a 28. In tutti questi i gruppi sono esclusi i terzi molari.

Altri criteri presi in esame per la campionatura, riguardavano test sulle capacità cognitive dei soggetti, quali abilità visuospatiali e di linguaggio e capacità di memoria. In oltre è stata valutata la presenza o l'assenza dell'allele APOE 4 attraverso materiale genetico proveniente o dalla cavità orale dei pazienti o da sezioni anatomiche del cervello dei soggetti deceduti. In aggiunta è stato valutato anche l'aspetto anatomopatologico delle lesioni, effettuando una classificazione in base alla loro gravità.

Le conclusioni dello studio hanno riportato le seguenti evidenze:

- 32 dei 144 partecipanti dello studio, presentavano demenza al primo esame cognitivo. Lo studio non chiarisce per quanto tempo queste suore avessero avuto problemi cognitivi e se gli elementi dentari fossero stati estratti prima o dopo il manifestarsi di tali sintomi. Inoltre non era nota la causa della perdita degli elementi. Tutti questi soggetti sono stati tenuti fuori dalle successive analisi effettuate.

- I restanti 112 che, al primo esame cognitivo, non hanno manifestato sintomi neurodegenerativi e che rientravano nel gruppo da 0 a 9 elementi dentari, hanno presentato un maggior rischio di sviluppare demenza, rispetto a quelli che avevano più di 10 denti.
- È stato appurato un maggior rischio per coloro che non presentavano l'allele APOE 4. Infatti: nei partecipanti senza l'allele APOE 4 e con un basso numero di denti (da 0 a 9) il rischio di avere demenza era notevolmente incrementato al primo esame cognitivo (OR=6.4), in confronto ai partecipanti che rientravano nel gruppo da 17 a 28 elementi dentari. Questo aumento di disparità non si riscontra in quei partecipanti che hanno l'allele APOE 4. Presumibilmente l'APOE 4 è un fattore di rischio per la malattia di Alzheimer tanto significativo da modificare in modo evidente la connessione esistente tra il numero dei denti e la demenza.
- È stato confermato il possibile ruolo delle citochine pro infiammatorie che vengono rilasciate nel circolo sistemico, come possibile agenti per le alterazioni neuropatologiche. Infatti in tale studio è stato evidenziato un aumento della Interleuchina 6 (liberate in corso di malattia parodontale) riscontrate intorno e

dentro alle placche senili (esami istopatologici). Tale citochina, secondo i risultati di questo studio, favorisce l'induzione e la precipitazione della β amiloide, insieme all'Interleuchina 1 (ricordiamo che la presenza di polimorfismo del gene IL1- α -889 determina un rischio 10 volte superiore di sviluppare malattia di Alzheimer e in misura minore di sviluppare la malattia parodontale). Senza ottenere un rilevante valore statistico, ma dando solo delle indicazioni, è stata valutata (nell'ambito del quadro infiammatorio) anche la presenza di malattie infiammatorie sistemiche come possibile cofattore nel determinare un incremento del sintomo della demenza in quei soggetti che facevano parte del gruppo da 0 a 9 elementi dentari.

- Sebbene i ricercatori avessero corredato lo studio anche di radiografie, queste, non rispettando parametri standardizzati (metodiche, materiali e irraggiamento) non possono essere utilizzate come prove affidabili al fine dello studio.

Tale studio, oltre a ipotizzare il ruolo delle parodontiti, pone la possibilità che, nell'associazione tra perdita degli elementi dentari e demenza, possa interferire una serie di fattori confondenti, quali: malattie in giovane età, incuria, disagio socio-economico, carenze nutrizionali (tutti fattori che non è stato possibile misurare né

osservare). Questi fattori possono influenzare lo sviluppo del cervello in età giovane, favorendo poi l'insorgenza della demenza. I ricercatori hanno condotto tale studio cercando di eliminare elementi confondenti, prendendo un campione da una popolazione che presentava alto livello d'istruzione, abitudini di vita simili (non fumavano, non bevevano), astensione dalla vita sessuale, uguale trattamento sanitario. Tutto ciò al fine di ottenere un campione omogeneo per caratteristiche.

I ricercatori del *Nun Study*, sono giunti alla conclusione che ci sia un'associazione tra un basso numero di denti e la demenza in tarda età, tuttavia non sono riusciti a stabilire un rapporto di causalità sulla base della loro documentazioni.

La Relazione tra il numero di denti all'ultima visita e l'avvenuta perdita di denti dovuta a patologia parodontale, come determinato dalle note cliniche*				
<i>Numero di denti all'ultima visita odontoiatrica esclusi i terzi molari</i>	<i>Numero di partecipanti a rischio</i>	<i>Numero di partecipanti in percentuale che in passato ha avuto perdita di denti a causa di malattia parodontale</i>	<i>Media ± DS del numero dei denti persi a causa di malattia parodontale</i>	<i>Media ± DS relativa agli anni in cui sono stati in cura</i>
0	4	2 (50)	6.5 ±3.5	20.4 ± 8.6
1-9	27	10 (37)	3.4 ± 2.1	19.5 ± 9.8
10-16	29	10 (34)	2.0 ± 1.4	19.2 ±10.6
17-28	60	5 (8)	1.8 ±0.8	23.2 ± 9.6

** I dati implicano l'esclusione dei terzi molari*

Prevalenza della demenza al primo esame *				
<i>Gruppo</i>	<i>Numero di elementi dentari al primo esame cognitivo</i>	<i>Numero di partecipanti a rischio</i>	<i>Numero in percentuale con demenza al primo esame</i>	<i>Rapporto di disparità per la prevalenza della demenza (OR)</i>
Tutti i partecipanti	0	25	8 (32)	0.9
	1-9	26	10 (38)	1.8
	10-16	27	3 (11)	0.4
	17-28	66	11 (17)	1
Quelli privi dell'allele APOE 4	0	22	7 (32)	4.2
	1-9	20	6 (30)	6.4
	10-16	22	2 (9)	1.6
	17-28	48	2 (4)	1
Quelli dotati di allele APOE 4	0	3	1 (33)	0.1
	1-9	6	4 (67)	0.5
	10-16	5	1 (20)	0.3
	17-28	18	9 (50)	1

** I dati implicano l'esclusione dei terzi molari*

<i>Incidenza della demenza dopo il primo esame cognitivo *</i>					
<i>Gruppo</i>	<i>Numero di denti al primo esame</i>	<i>Numero di partecipanti a rischio</i>	<i>Numero di partecipanti con demenza</i>	<i>Incidenza dei casi di demenza per i centenari</i>	<i>Rapporto di incidenza di rischio per demenza</i>
<i>Tutti i partecipanti</i>	0-9	37	13	10	2.20
	10-28	74	19	4	1

** I dati implicano l'esclusione dei terzi molari*

STUDIO CLINICO DI A. HANAOKA e K. KASHIHARA

L'aumento della frequenza della malattia parodontale, associata alla presenza di un basso numero di denti, è stata messa in correlazione con la malattia di Parkinson [52], riscontrando un aumento dell'incidenza rispetto ai gruppi di controllo e ai gruppi che presentavano incidenti cerebrovascolari. Inoltre, si è notato che la perdita di questi elementi dentari era maggiore nei soggetti affetti da malattia di Parkinson rispetto a quelli che presentavano incidenti cerebrovascolari, pur rappresentando la malattia parodontale un probabile fattore di rischio per quest'ultimi. I risultati di questo studio indicano che la perdita degli elementi dentari, la carie e la malattia parodontale, presentano una maggiore frequenza anche nel primo stadio della patologia, quando ancora non sono manifesti i primi sintomi di disabilità funzionale nell'attività quotidiana, rappresentando una complicanza ricorrente in corso della malattia di Parkinson.

In contraddizione con i risultati di questo studio, alcuni ricercatori sono giunti a conclusioni apparentemente opposte [53] riscontrando una minore ricorrenza di malattie

parodontale, perdita di denti e carie in pazienti affetti da malattia di Parkinson rispetto ai soggetti del gruppo di controllo coetanei. Tuttavia, questo potrebbe essere dovuto ad un maggior controllo della salute dentale da parte dei pazienti presi in esame.

I sintomi parodontali sono risultati maggiormente presenti con l'aumentare dello stadio della malattia, rispetto sempre ai gruppi di campione presi in esame. Secondo i ricercatori, ciò può dipendere da sintomi e deficit motori (tremori, acinesia, rigidità muscolare), che rappresentano un ostacolo per il paziente nel mantenere un buono stato di igiene orale. È da ricordare che anche nella malattia di Parkinson un sintomo ricorrente è la demenza e ciò, insieme ai sintomi precedenti, può rappresentare un fattore importante nel mantenimento della salute parodontale. Secondo gli autori, la presenza di disfagia, di disturbi nella cinetica masticatoria e di xerostomia dovute a disfunzioni del sistema nervoso autonomo, insieme alla terapia farmacologica anti-parkinsoniana, possono ostacolare tutti quei meccanismi che favoriscono l'igiene orale. Tra questi è da riportare l'effetto di un abbassamento del PH salivare che può portare ad erosioni favorendo accumulo di placca e, di conseguenza, malattia parodontale[54].

Inoltre i pazienti affetti da malattia di Parkinson sono soggetti che tendono all'apatia, alla depressione e alla demenza, pertanto non sono accurati nel sottoporsi a visite odontoiatriche e neanche a mantenere abitudini di corretta igiene orale.

PAZIENTI	ETÀ MEDIA \pm DS	NUMERO	FEMMINE	MASCHI	EDENTULI (%)	CARIE NON CURATE (%)	TASCA PARODONTALE (%)
GRUPPO DI CONTROLLO	69.0 \pm 5.8	68	42	26	8.8	8.1	43.5
CVA	70.9 \pm 5.4	60	23	37	13.6	9.8	41.2
PD	72.1 \pm 5.5	89	51	38	20.2	53.5	98.6

CVA = Incidente cerebrovascolare

PD = Malattia di Parkinson

STUDIO SPERIMENTALE

Introduzione.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di chiarire il ruolo ed i meccanismi attraverso cui le infezioni croniche possono contribuire all'insorgenza e/o alla progressione di malattie croniche complesse che caratterizzano l'invecchiamento patologico, in particolare il declino cognitivo e le patologie neurodegenerative. A tale scopo, è stato utilizzato, come modello umano di infezione cronica, la parodontite.

Nel setting clinico su tale obiettivo, sono stati reclutati pazienti affetti solo da parodontite i cui dati sono stati utilizzati come controllo nella comparazione con gli analoghi dati dei pazienti con impairment cognitivo.

In particolare, la nostra indagine si è concentrata sulla valutazione proteomica del fluido orale in diverse condizioni di impairment cognitivo e di salute parodontale per la ricerca di potenziali biomarkers utili alla loro caratterizzazione clinico-prognostica. Infatti, l'interazione microbi-ospite che caratterizza la parodontite si traduce nella produzione di mediatori infiammatori/immunologici attivi sia a livello locale (danno parodontale) che sistemico (partecipazione alla fisiopatologia dell'invecchiamento). L'analisi di tali mediatori può risultare incompleta in relazione a limiti legati alla metodica di analisi (sensibilità, complessità), alla tipologia di marcatore vagliato (ricerca limitata ai principali o più noti), al substrato biologico analizzato (siero, fluido crevicolare, saliva). Tali limitazioni possono essere agevolmente superate da tecnologie emergenti, come quella proteomica, in grado di analizzare l'intera composizione proteica di un campione e di identificarne minime differenze in campioni diversi, e dall'utilizzo di una matrice diagnostica rappresentativa di fenomeni locali e sistemici: è questo il caso del fluido

orale, nella cui composizione rientrano saliva, fluido crevicolare e componente batterica orale.

Materiali e metodi

Il gruppo di studio era composto da 10 pazienti (5 maschi e 5 femmine) affetti da morbo di Alzheimer con età media di 67,4 anni (range 61 – 73). Il gruppo controllo era formato da 15 pazienti (9 maschi e 6 femmine) affetti da parodontite cronica con età media di 64,8 anni (range 51 – 74).

I soggetti inseriti nei gruppi di studio e controllo sono stati valutati da un punto di vista parodontale allo scopo di definirne lo status; particolare attenzione è stata dedicata alla definizione, classificazione e caratterizzazione della malattia parodontale presente, dei parametri (profondità di sondaggio, recessione, perdita di attacco) e degli indici di flogosi gengivale (sanguinamento al sondaggio) e di colonizzazione batterica (indice di placca). I dati sono stati raccolti in un form digitale di cartella parodontale.

A tutti è stato effettuato un prelievo di saliva intera, aspirando con una siringa sterile un ml di fluido orale dal pavimento della bocca. La raccolta di saliva è stata eseguita al mattino, almeno due ore dopo la colazione, dopo che il paziente aveva effettuato uno sciacquo con acqua per rimuovere residui grossolani.

I campioni di saliva sono stati congelati (-80 °C) entro 1 ora dalla raccolta. Previo scongelamento in ghiaccio, i campioni sono stati quindi centrifugati (10 minuti; 13000 x g). Il sovrantante è stato raccolto e trattato con soluzione denaturante (urea 9M + CHAPS 2% + DTT 100mM), aliquotato ed applicato su ProteinChip di tipo Q10 (precedentemente lavati due volte con soluzione tampone, seguendo le istruzioni del fabbricante). La superficie del chip è stata ricoperta con acido sinapinico, usato quale energy absorbing matrix al fine di facilitare la ionizzazione delle molecole del campione

per l'analisi SELDI-TOF-MS (surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry). Per l'analisi dei chip è stato utilizzato il seguente setting dello spettrometro: laser energy 6000 nJ; matrix attenuation 2500; focus mass 10000; sample rate 800; covering 25% of the surface area of the spot; acquired mass range from 2500 to 25000.

Analisi biostatistica

Le medie per i parametri parodontali rilevati sono state considerate rappresentative dei singoli casi ed usate per analizzare le differenze tra gruppo di studio e controllo. A tale scopo è stato usato il Mann-Whitney test (level of significance: $p < 0.05$).

Il profilo proteomico di tutti i campioni è stato analizzato con il software BIORAD DataManager™ (Ver 3.5) per identificare i picchi di massa di proteine espresse in maniera significativamente diversa tra i gruppi analizzati. In particolare, le differenze tra i picchi proteomici sono state valutate mediante Mann-Whitney test (level of significance: $p < 0.05$).

Per l'analisi multivariata (CART), i campioni sono stati divisi casualmente in due gruppi (training set e testing set) per costruire e validare l'albero di classificazione, rispettivamente. L'intensità (μA) di tutti i picchi comuni identificati nel training set è stato trasferito al Biomarker Pattern Software (BPS ®) per costruire un albero di classificazione. Le intensità dei picchi selezionati sono stati sottoposti al BPS ® come un "nodo Root". Sulla base dell'intensità del picco, è stata determinata dal BPS ® una soglia per classificare il nodo radice in due nodi figli. Se l'intensità del picco di un campione, in cieco, fosse inferiore o uguale alla soglia, questo picco verrebbe classificato come "nodo figlio laterale sinistro". Picchi di intensità superiore alla soglia

sarebbero come "nodo figlio destro". Dopo le reiterazioni del processo decisionale sul training set è stata valutato il potere discriminatorio sui campioni rimanenti (testing set). La sensibilità è stata definita come la probabilità di predire il morbo di Alzheimer, mentre la specificità è stata definita come la probabilità di predire campioni sani (solo parodontite).

La classificazione dei gruppi di pazienti/campioni è stata anche eseguita mediante una rete neurale artificiale di tipo supervisionato. Il dataset dei casi disponibili è stato suddiviso in due metà omogenee: la prima è servita da "training set" per l'addestramento della rete neurale, che è stata successivamente validata sulla seconda parte (il "validation set"). L'implementazione è stata effettuata testando nell'ambiente di calcolo Mathematica tre tipologie di reti neurali artificiali "supervised": VQ (Vector-Quantization), FF (Feed-Forward) e RBF (Radial-Basis Function).

Risultati

I parametri clinici rilevati hanno evidenziato un significativo aumento degli indici di placca e di sanguinamento al sondaggio nel gruppo di studio ($p < 0,05$), il che potrebbe essere giustificato dalla minore abilità e frequenza nell'eseguire una normale igiene orale. A fronte di ciò, non si è accertata significatività statistica nelle differenze per gli altri parametri parodontali clinici; ciò lascia, verosimilmente, supporre che lo status parodontale non differisce in maniera sostanziale nei due gruppi.

L'analisi proteomica ha mostrato 10 picchi espressi in maniera significativamente diversa nella saliva del gruppo di studio rispetto ai controlli. I dettagli sono riportati nella Tabella 1. L'analisi CART non è tuttavia riuscita a costruire un albero classificativo valido (sensibilità 8%, specificità 12%).

Anche l'approccio statistico mediante reti neurali non ha prodotto risultati accettabili nella classificazione dei casi (sani-malati), avendo tutte un alto tasso di errore (> 90%).

Tabella 1: picchi espressi in maniera significativamente diversa (Mann-Whitney test: $p < 0.05$). nel gruppo di studio rispetto ai controlli

m/z	p-value	ROC	trend in gruppo di studio	Fold Change (gruppo studio Vs. controlli)
7.737	< 0.01	0,538194444	reduced	-2,29
9.793	< 0.01	0.7714285714285715	reduced	-2,95
9.724	< 0.05	0.7499999999999999	reduced	-2,8
11.064	<0.05	0.7285714285714285	reduced	-2,82
11.002	<0.05	0,052083333	reduced	-3,57
9.609	<0.05	0.7285714285714286	reduced	-2,12
10.930	<0.05	0.7071428571428571	reduced	-2,31
16.807	< 0.01	0,25	increased	2,75
17.127	<0.05	0.31428571428571433	increased	2
17.549	<0.05	0.26428571428571423	increased	3

DISCUSSIONE

Le patologie neurodegenerative ed il conseguente declino cognitivo rappresentano un elemento di sicura preoccupazione per la salute pubblica visto l'aumento della loro incidenza, l'allungamento dell'aspettativa di vita, nonché il grosso impatto sulla qualità di vita. A fronte di tale preoccupazione vi è la constatazione che le conoscenze fisiopatologiche in merito ad esse sono ancora non esaustive, per cui l'approccio preventivo legato al controllo dei fattori di rischio noti e/o potenziali potrebbe significare un più efficace management del paziente e conseguentemente migliori qualità di vita. Pertanto, il presente studio si è posto l'obiettivo di valutare, sulla base delle evidenze scientifiche disponibili, se esistono aspetti della malattia parodontale che, potenzialmente, possono metterla in relazione alla patogenesi delle malattie neurodegenerative e rappresentare, così, un fattore di rischio per esse; ciò potrebbe essere di assoluto rilievo visto che la malattia parodontale al momento è pienamente trattabile e prevenibile.

L'analisi della letteratura ha permesso di evidenziare come la malattia parodontale possa contribuire al quadro infiammatorio periferico attraverso un effetto diretto da parte dei batteri patogeni parodontali o indiretto determinato dalle citochine pro-

infiammatorie prodotte localmente a livello parodontale a seguito della colonizzazione batterica dei difetti parodontali; tale contributo potrebbe avere un ruolo come possibile cofattore nell'indurre o accelerare il decorso della malattia di Alzheimer in virtù delle più recenti teorie eziopatogenetiche che riconoscono ai meccanismi infiammatori un ruolo chiave in tale patologia.

Analizzando le caratteristiche di entrambe le malattie, ci siamo soffermati sugli aspetti comuni: elevata prevalenza, picco di incidenza, patogenesi infiammatoria, ecc...

L'ipotesi suggerita dalla letteratura è che la carica batterica e il processo infiammatorio legati alla malattia parodontale possano intensificare l'infiammazione a livello del sistema nervoso centrale favorendo, eventualmente, l'insorgenza della malattia. Benché nessuna prova diretta associ la malattia parodontale alla malattia di Alzheimer, evidenze preliminari indirette vengono proposte in tal senso dai pochi studi epidemiologici e clinici attualmente disponibili. In particolare, l'analisi del "Nun study" ha suggerito che la presenza di un basso numero di denti è in associazione con la presenza di demenza in tarda età; tuttavia, esso non è stato in grado di stabilire se questa associazione sia del tutto causale o casuale.

Lo studio condotto sulla base dei dati derivanti dal NHANES III (*The Third National Health and Nutrition Examination Survey*)[51] ha messo in associazione la presenza di alti livelli di IgG nei confronti *P.gingivalis* (patogeno parodontale specifico) con una maggiore possibilità di andare incontro a compromissione della memoria e delle capacità cognitive. È stata, infatti, riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra IgG, *P. gingivalis* e demenza.

Altri studi presi in analisi hanno messo in relazione la demenza in corso di malattia di Parkinson con la perdita di elementi dentari, carie e malattia parodontale, non facendo però luce sul possibile ruolo di quest'ultima nell'innescare la neurodegenerazione.

Nella nostra sperimentazione è stato evidenziato un significativo aumento degli indici di placca e di sanguinamento al sondaggio nel gruppo di studio, in dipendenza verosimilmente di una ridotta abilità e frequenza nell'eseguire una normale igiene orale.

L'esiguo numero di pazienti non ha consentito di valutare una eventuale relazione causale tra status parodontale e patologia neurodegenerativa. Tuttavia, è stato riscontrato che il proteoma salivare risulta essere diverso nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer rispetto ai casi di sola parodontite, anche se non è stato possibile identificare

un pannello di marcatori nei picchi differenzialmente espressi che sia capace di predire la diagnosi.

Tuttavia, questi risultati preliminari sono incoraggianti e suggeriscono la necessità di studi futuri su casistiche più ampie. Infatti, se le attuali ipotesi dovessero essere validate una simile acquisizione avrebbe immediate e significative implicazioni. In particolare, la prevenzione ed il trattamento della malattia parodontale potrebbe ridurre il profilo di rischio del paziente rispetto al potenziale sviluppo, gravità e la progressione della malattia di Alzheimer.

BIBLIOGRAFIA

1. Ainamo, J., Epidemiology of Periodontal Disease. In: Lindhe. J. Textbook of Clinical Periodontology, 1989.
2. Haffajee, S.S.S.a.A.D., Dental biofilms: difficult therapeutic targets,. Periodontal, 2002. 28: p. 12-55.
3. B.J. Paster, I.O., J.A. Aas and F.E. Dewhirst, The Breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and others oral sites. Periodontal 2006. 42: p. 80-87.
4. Haffajee, S.S.S.a.A.D., The nature of periodontal diseases. Ann Periodontal 1997. 2: p. 3-10.
5. J., G.R., Bacterial adhesion to oral tissues : a model for infectious disease. Journal of dental Research, 1989. 68: p. 750-760.
6. Simpson D.L., B.P.a.T.N.S., Killing of Human myelomonocytic leukemia and lymphocytic cell lines by Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin. Infection and Immunity, 1988. 56: p. 1162-1166.
7. T. Berglundh and M. Donati, Aspects of adaptive host response in periodontitis J Clin Periodontal, 2005. 32: p. 87-107.

8. J.M. Kramer and S.L. Gaffen, Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy, J Periodontol, 2007. 78: p. 1083-1093.
9. E.F. Berbari, F.R.C.r.a.J.M.S., Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganism, Mayo Clin Proc, 1997. 72: p. 532-542.
10. E.E. Zijlstra, G.R.S., F.J. Godfroy and J.E. Degener, Pericarditis, pneumonia and brain abscess due to a combined Actinomyces-Actinobacillus actinomycetemcomitans infection. J Infect, 1992. 25: p. 83-87.
11. G.J. HO, R.D., E. Hakimiaan and E. Masliah, Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease, Curr drugs Targets inflamm, in Allergy. 2005. p. 247-256.
12. P.L. McGeer and E.G. McGeer, P., Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease, Neurobiology Aging 2001. 22: p. 799-809.
13. P.L. McGeer and E.G. McGeer, POLymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease Arch Neuronal, 2001. 58: p. 1790-1792.
14. H. AkiYama, S.B., S. Barnum, B. Bradt, J. Baurer, G.M. Cole, N.R. Cooper, P.EiKelenboom, M.Emmerling, B.I. Fiebich, C.E. Finch, S. Frautschy, W.S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I.R. Mackenzie, P.L. McGeer, M.K.

O'Banion, J. Pachter, G. Painetti, C. Plata_Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F.L. Van Muiswinkel, R. Veerbuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk and T. Wyss-Coray,, Inflammation and Alzheimer's disease. *neurobiology Aging*. 21: p. 383-421.

15. L. Meda, M.A.C., G.I. Szendrei, L. Otvos, Jr., P. Baron, M. Villalba, D. Ferrari and F. Rossi,, Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon.gamma,. *Nature*, 1995. 374: p. 647-650.

16. L. Meda, P.B.a.G.S., *Neurobiology Aging*, 2001. 22: p. 885-893.

17. A. Klegeris, D.G.W.a.P.L.M., Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide with the human monocytic cell line THP-1 result in a protein Kinase C-dependet secretion of tumor necrosis factor-alpha, *Brain Res*. 1997. 747: p. 114-121.

18. L.F. Lue, R.R., E.F. Brigham, L.B. Yang, H. Hampel, G.M. Murphy, Jr., L. Brachova, S.D. Yan, D.G. Walker, Y. shen and J Rogers, , Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 2001. 35: p. 72-79.

19. K. Yasojima, C.S., E.G. McGeer and P.L. McGeer,, Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease,. *Brain Res*, 2000. 887: p. 80-89.
20. H. K. Kuo, C.J.Y., C.H. Chang, C.K. Kuo, J.H. Chen and F. Sorond,, Relation of C-reactive protein to stroke, cognitive disorders, and depression in the general population:systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 2005. 4: p. 371-380.
21. C.E. Teunissen, M.P.v.B., H. Bosma, E. Bosmans, J. Delanghe, C. De Bruijn, A. Wauters, M. Maes, J.Jolles, H.W. Steinbusch and J. de Vente,, Inflammation markers in relation to cognition in a healthy aging population,. *J neuroimmunol*, 2003. 134: p. 142-150.
22. Z.S. Tan, A.S.B., R.S. Vasan, R. Roubenoff, C.A. Dinarello, T.B. Harris, E.J. Benjamin, R. Au, D.P. Kiel, P.A. Wolf and S.Seshandri,, Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study,. *Neurology*, 2007. 68.
23. S. Ray, M.B., C. Herbet, Y. Takeda-Uchimura, A. Boxer, K. Blennow, L.F. Fiedman, D.R. Galasko, M. Jutel, A. Karydas, J.A. Kaye, J. Leszek, B.L. Millen, L. Minthon, J.F. Quinn, G.D. Rabinovici, W.H. Robinson, M.N. Sabbagh, Y.T. So, D.L. Sparks, M. Tabaton, J. Tinklenberg, J.A. Yesavage, R. Tibshirani and T.Wyss-Coray,

Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins,. *Nat Med*, 2007. 13: p. 1359-1362.

24. McGeer, P.L.M.a.E.G., Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann N Y Accad Sci* 1996. 777: p. 213-220.

25. J. A. Nicoll, R.E.M., D.I. Graham, J. Stewart, G. Wilcock, S. MacGowan, M.M. Esiri, L.S. Murray, D. Dewar, S. Love, T. Moss and W.S. Griffin, , Association of Interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 2000. 47: p. 365-368.

26. W.A. Banks, Mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des*, 2005. 11: p. 973-984.

27. Banks, N.Q.a.W.A., Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun*, 2007. 21: p. 727-735.

28. C.M. Blatteis, The afferent signalling of fever. *J Physiol*, 2000. 526: p. 470.

29. C.M. Blatteis, E.S.a.S.L., Pyrogen sensing and signaling: old Views and new concepts. *Clin infect Dis*, 2000. 31: p. 168-177.

30. J.P. Konsman, B.D.a.A.M.V.D., perivascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci Lond*, 2007. 112: p. 1-25.

31. J. Licinio and M.L. Wong, Pathways and mechanism for cytokine signaling of the central nervous system,. J Clin Invest, 1997. 100: p. 2941-2947.
32. R. Dantzer, J.P.K., R.M. Bluthé and K.W. Kelly,, Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? Auton Neurosci, 2000. 85: p. 60-65.
33. S. Rivest, Molecular insights on the cerebral innate immune system, . Brain Behav Immun, 2003. 17: p. 13-19.
34. J.G. Sheng, S.H.B., G. XU, D.R. Borchelt, D.L. Price and V.E. Koliatsos, Lipopolysaccharide-Induced-Neuroinflammation increases intracellular accumulation of Amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP-swe transgenic mice Neurobiol Dis, 2003. 14: p. 133-145.
35. B.J. Balin, H.C.G., E. J. Arking, D.M. Appelt, P.J. Branigan, J.T. Abrams, J.A. Whittum-Hudson and A.P. Hudson,, Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. Med Microbiol Immunol, 1998. 187: p. 23-42.
36. Angela R. Kamer, A.P.D., Ronald G. Craig, Lidia Glodzik-Sobanska, Miroslaw Bry and Mony J. de Leon, Alzheimer's Disease and Peripheral infections: The Possible

Contribution from periodontal infections, Models and Hypothesis. Journal of Alzheimer's Disease, 2008. 13: p. 437-449.

37. H. AkiYama, T.A., H. Kondo, E. Tanno, C. Haga and K. Ikeda,, Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain,. Alzheimer Dis Assoc disord (Suppl 1), 2000. 14: p. S47-S53.

38. J. Miklossy, Alzheimer's disease-a spirochetosis? Neuroreport, 1993. 4: p. 1069.

39. F. Foschi, J.I., H. Sasaki, V. Sambri, C. Prati, R.Muller and P.Stashenko, Treponema denticola in disseminating endodontic infections,. J Dent Res, 2006. 85: p. 761-765.

40. L. Shapira, S.A.a.T.B., Effects of Porphyromonas gingivalis on the central nervous system: activation of glial cells and exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis,. J Periodontol, 2002. 73: p. 511-516.

41. L. Shapira, s.T., S. Amar and T.E. Van Dyke, Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation of human monocytes: Dependence on serum and CD14 receptor,. Oral Microbiol Immunol, 1994. 9: p. 112-117.

42. R. Kkktet, M.L.L., L.A. Aarden and A.J. van Winkelhoff,, Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria,. *Oral Microbiol Immunol*, 2007. 22: p. 145-151.
43. S. Offenbacher, E.L.R., S.P. Barros, Y.A. bobetsis, D. Lin and J. D. Beck, Effects of maternal *Campylobacter rectus* infection on murine placenta, fetal and neonatal survival, and brain development,. *J Periodontol*, 2005. 76: p. 2133-2143.
44. G.R. Riviere, K.H.R.a.K.S.S., Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease,. *Oral Microbiol Immunol*, 2002. 17: p. 113-118.
45. Wardlaw, A.J.F.a.J.M., Blood-brain barrier: Ageing and microvascular disease - systematic review and metanalysis *Neurobiol Aging*, 2007.
46. K. Kondo, M.N.a.K.S., A case-control study of Alzheimer's disease in Japan - significance of life-styles,. *Demantia* 1994. 5: p. 314-326.
47. R. Stewart and V. Hirani, Dental Health and cognitive impairment in an English national survey population,. *J Am Geriatr Soc*, 2007. 55: p. 1410-1414.

48. J. M. Kim, R.S., M. Prince, S.W. Kim. S.J. Yang, I.S. Shing and J.S. Yoon,,
Dental health, nutritional status and recent-onset dementia in a Korean community
population,. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2007 22: p. 850-855.
49. M. J. Gats M, F.L., Johansson B, Berg S, Reynolds Ca, Pedersen NL, ,
Potentially modifiable risk factors for denantia in identical twins,. *Alzheimers
Dementia*, 2006. 2: p. 110-117.
50. P. S. Stein, M.D., S.J. Donegan, J.F. Yepes and R.J. Kryscio., Tooth loss,
dementia and neuropathology in the Nun Study. *J Am Dent Assoc*, 2007. 138: p. 1314-
1322.
51. J. M. Noble, L.N.B., P. N. Papapanou, M. S. V. Elkind, N. Scarmeans, C. B.
Wright, Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults:
analysis of NHANES-III. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009. 80: p. 1206-1211.
52. Ayumi Hanaoka, K.K., Icreased frequencies of caries, periodontal disease and
tooth loss in patients with Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2008.
16: p. 1279-1282.
53. Persson M. Osterberg T, G.A.-K., et al., Influence of Parkinson's disease on oral
health. *Acta Odontol Scand*, 1992. 50: p. 37-42.

54. Tumilasci OR, C.M., Belforte JE, et al. , Quantitative study of salivary secretion in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2006. 21: p. 660-7.

Appendice. Percorso scientifico del dottorando.

1. Biomarkers of periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement in mice and men: overview and clinical relevance. d'Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurrò A, Silvestrini-Biavati A, Perillo L. *ScientificWorldJournal*. 2013 Apr 23;2013:105873. doi: 10.1155/2013/105873. Print 2013. Review.

2. Unilateral posterior crossbite in adolescents: surface electromyographic evaluation. Ciavarella D, Monsurrò A, Padricelli G, Battista G, Laino L, Perillo L. *Eur J Paediatr Dent*. 2012 Mar;13(1):25-8.

3. Saliva analysis by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) in orthodontic treatment: first pilot study. Ciavarella D, Mastrovincenzo M, D'Onofrio V, Chimenti C, Parziale V, Barbato E, Lo Muzio L. *Prog Orthod*. 2011 Nov;12(2):126-31. doi: 10.1016/j.pio.2011.06.002. Epub 2011 Jul 26.

4. Condylar position indicator and T-scan system II in clinical evaluation of temporomandibular intracapsular disease. Ciavarella D, Parziale V, Mastrovincenzo M, Palazzo A, Sabatucci A, Suriano MM, Bossù M, Cazzolla AP, Lo Muzio L, Chimenti C. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012 Jul;40(5):449-55. doi: 10.1016/j.jcms.2011.07.021. Epub 2011 Aug 30.

5. Maxillary bone lesions in McCune-Albright syndrome: a case report. Leopardi M, Parziale V, Ciavarella D, Chimenti C. *Prog Orthod*. 2011;12(1):84-9. doi:10.1016/j.pio.2010.09.008. Epub 2010 Oct 8.

6. Inhibiting proliferation in KB cancer cells by RNA interference-mediated knockdown of nicotinamide N-methyltransferase expression. Pozzi V, Mazzotta M, Lo Muzio L, Sartini D, Santarelli A, Renzi E, Rocchetti R, Tomasetti M, Ciavarella D, Emanuelli M. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Jan-Mar;24(1):69-77.

Atti di congressi.

1. **Edentulism and obstructive sleep apnea: a case report.** Ciavarella D., Battista G., Giannone N., De Lillo A., Avvanzo P.L., Carella M., Campisi G., Guida L. Congresso Nazionale dei Docenti di Discipline Odontostomatologiche **Firenze-Siena** 14-16 Aprile 2011.
2. **Instrumental Evaluation of II class Malocclusion.** Battista G., Guida L., Fino F., Termine N., Carella M., Suriano M.M., Dioguardi M., Ciavarella D. Congresso Nazionale dei Docenti di Discipline Odontostomatologiche **Firenze-Siena** 14-16 Aprile 2011.
3. **Ulcerazione orale da citomegalovirus.** Dioguardi M., Fino F., Santarelli A., Ciavarella D., Lo Russo L., Lo Muzio L. XI Congresso Nazionale – I Congresso Internazionale S.I.P.M.O. 18 Giugno 2011 – Pugnochiuso (FG).
4. **A Rare Case Of Fracture Of The Anterior Wall Of Left External Auditory Canal After Trauma, During A Long Dental Sitting.** A. Giannone, D. Ciavarella, M. Mastrovincenzo, A. Luchetta, A. Sabatucci. Congresso Nazionale Dei Docenti Di Discipline Odontostomatologiche 12-14 Aprile 2012.
5. **Dental Occlusion And Posture: A Double-Blind Clinical Study.** G. Battista, F. Violante, M. Di Cosola, L. Guida, A. De Lillo, D. Ciavarella. Congresso Nazionale Dei Docenti Di Discipline Odontostomatologiche 12-14 Aprile 2012.
6. **Evaluation Of Modification On Vertical And Sagittal Mandibular Growth And Hyoid Position After Function Generating Bite (Fgb) Treatment On Child.** De Lillo A., Montaruli G., Battista G., Guida L., Ciavarella D. Atti Del Xix Congresso Del Collegio Dei Docenti. 12-14 Aprile 2012.
7. **Cephalometric evaluation of tongue and pharyngeal airway space in children with altered tongue position** L. Guida¹, N. Giannone¹, L. Locurcio¹, C. Di Alberti², F. Donnini², D. Ciavarella¹, L. Pastore¹, L. Di Alberti¹
CONGRESSO NAZIONALE DEI DOCENTI DI DISCIPLINE ODONTOSTOMATOLOGICHE “Evidenza Scientifica, interdisciplinarietà tecnologie applicate”
Roma 18-20 Aprile 2013.
8. **Treatment of open-bite malocclusion with “Swallowing Occlusal Interceptor Appliance”.** Caiavarella D., Battista G., Sarcina M., De Lillo A., PAdovano di Leva A., Mastrovincanzo M., Campisi G. *CONGRESSO NAZIONALE DEI DOCENTI DI DISCIPLINE ODONTOSTOMATOLOGICHE “Evidenza Scientifica, interdisciplinarietà tecnologie applicate”*
Roma 18-20 Aprile 2013
9. **Uncommon diagnosis of Kaposi's Sarcoma in a HIV-negative adult patient.** Paderni C., Rodolico V., Ciavarella D., Lo Muzio L., Campisi G. Supplement to "Annali di Stomatologia" vol. IV-n.2 - April/June 2013

I seguenti lavori scientifici hanno avuto attinenza con il percorso di ricerca del dottorato di ricerca del candidato:

1. Biomarkers of periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement in mice and men: overview and clinical relevance. d'Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurrò A, Silvestrini-Biavati A, Perillo L. *ScientificWorldJournal*. 2013 Apr 23;2013:105873. doi: 10.1155/2013/105873. Print 2013. Review.
2. Saliva analysis by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) in orthodontic treatment: first pilot study. Ciavarella D, Mastrovincenzo M, D'Onofrio V, Chimenti C, Parziale V, Barbato E, Lo Muzio L. *Prog Orthod*. 2011 Nov;12(2):126-31. doi: 10.1016/j.pio.2011.06.002. Epub 2011 Jul 26.