

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ODONTOIATRIA PER DISABILI**

**Ciclo: XXIV**

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/F1 MED-28**

**Caratterizzazione della flora microbica orale in diverse categorie  
di pazienti sindromici in età evolutiva.**

**Presentata da :**  
Dr.ssa Caterina VOCALE

**Coordinatore :**  
Prof. L. BOLONDI

**Relatore:**  
Prof. Vittorio SAMBRI



*“..già più d'una volta c'è occorso di far menzione del nostro lavoro; ma c'è occorso sempre in momenti di gran fretta: sicché non abbiám mai potuto darne più che un cenno alla sfuggita. Ora però, all'intelligenza del nostro racconto si richiede proprio d'averne qualche notizia più particolare. Son cose che chi conosce la storia le deve sapere; ma siccome, per un giusto sentimento di noi medesimi, dobbiam supporre che quest'opera non possa esser letta se non da ignoranti, così non sarà male che ne diciamo qui quanto basti per infarinarne chi n'avesse bisogno.”*

*Cap.XXVII-  
I promessi sposi*

## **Indice**

<b><u>INTRODUZIONE</u></b> .....	9
----------------------------------	---

## **CAPITOLO 1: “ Displasia Ectodermica”**

<i>1.1 Inquadramento storico-epidemiologico</i> .....	11
<i>1.2 Genetica: Regolazione genica ed alterazioni cromosomiche</i> .....	13
<i>1.3 Classificazioni delle Displasie</i> .....	21
<i>1.4 Manifestazioni cliniche</i> .....	25
<i>1.5 Diagnosi pre e post natale</i> .....	33
<i>1.6 Approccio odontostomatologico</i> .....	36

## **CAPITOLO 2: “Sindrome di Down”**

<i>2.1 Inquadramento storico-epidemiologico</i> .....	42
<i>2.2 Genetica: Regolazione genica ed alterazioni cromosomiche</i> .....	46
<i>2.3 Diagnosi pre e post natale</i> .....	52
<i>2.4 Manifestazioni cliniche della SD</i> .....	56
<i>2.4.1 Anomalie Sistemiche</i> .....	57
◦ Apparato cardio-circolatorio	
◦ Sistema Immunitario	
◦ Sistema Nervoso Centrale	
◦ Apparato muscolo-scheletrico	
◦ Patologie dermatologiche	
◦ Patologie gastrointestinali	
◦ Patologie tiroidee	
<i>2.4.2 Anomalie Cranio-Facciali</i> .....	69
◦ Crescita e sviluppo della base cranica	
◦ Caratteristiche palatali	
◦ Caratteristiche linguali	
◦ Anomalie funzionali	
◦ Anomalie dentali	
◦ Approccio odontostomatologico	

**CAPITOLO 3: “Microbiologia del cavo orale”**

<i>3.1 Microbiologia del cavo orale.....</i>	<i>79</i>
◦ Formazione della placca sopra e sub-gengivale	
◦ Flora microbica e patologie del cavo orale in pazienti sindromici	
<i>3.2 Scopo della Ricerca.....</i>	<i>92</i>

**CAPITOLO 4: “Materiali e Metodi ”**

<i>4.1 Gruppi di studio.....</i>	<i>94</i>
<i>4.2 Indagini condotte.....</i>	<i>95</i>
<i>4.2.1 Valutazione dello stato di salute del cavo orale: Gruppo 1</i>	
<i>4.2.2 Valutazione dello stato di salute del cavo orale: Gruppo 2</i>	
<i>4.3 Esame colturale.....</i>	<i>97</i>
<i>4.4 Esame molecolare.....</i>	<i>101</i>
<i>4.4.1 Estrazione DNA batterico</i>	
<i>4.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....</i>	<i>103</i>
◦ Ricerca <i>T. denticola</i>	
◦ Ricerca <i>P. gingivalis</i>	
◦ Ricerca <i>P.intermedia</i>	
◦ Ricerca <i>A. actinomycetemcomitans</i>	
◦ Ricerca <i>T.forsythensis</i>	
<i>4.4.3 Elettroforesi su gel d'agarosio.....</i>	<i>109</i>
<i>4.5 Elaborazione statistica dei dati.....</i>	<i>109</i>

---

**CAPITOLO 5: “ Risultati e Conclusioni”**

<b>5.1 Risultati gruppo di studio 1</b> .....	111
<b>5.2 Risultati gruppo di studio 1</b> .....	127
<b>5.3 Conclusioni</b> .....	134
<b>5.4 Bibliografia</b> .....	137

- *Capitolo 1*
- *Capitolo 2*
- *Capitolo 3*

## **Introduzione**



## **INTRODUZIONE**

La salute orale dei soggetti affetti da patologie sistemiche responsabili di disabilità fisiche e/o psichiche, in particolare in età evolutiva, è un obiettivo da perseguire di primaria importanza al fine di migliorare la qualità della vita del bambino e garantirgli un buon inserimento nel contesto sociale.

Ricerche sperimentali e cliniche hanno individuato i momenti eziopatogenetici delle diverse problematiche che si riscontrano a carico del cavo orale, con una frequenza superiore nei pazienti disabili rispetto alla restante popolazione, attribuendo ai batteri formanti la placca e a quelli con la capacità di indurre un danno parodontale un ruolo chiave.

Diversi sono stati i protocolli di prevenzione e terapia proposti nel tempo, costruiti proprio in relazione all'età del soggetto ed alla tipologia della disabilità; tuttavia risulta di fondamentale importanza chiarire il complesso rapporto tra la popolazione microbica orale e l'ospite nello stato di malattia.

In un contesto del genere, intento del lavoro di ricerca è proprio quello di portare a termine un progetto di bonifica dentaria su un gruppo di pazienti in età compresa tra i 2 e i 17 anni, affetti da patologie sistemiche e patologie del cavo orale, sulla base di un profilo microbiologico, a partire da tamponi salivari e prelievi parodontali.

Stilando il profilo microbiologico del “gruppo campione” e confrontandolo con quello di un gruppo di pazienti di controllo, lo studio si propone di riuscire a delineare i miglioramenti, qualora ci fossero, post terapia odontostomatologica e di riuscire a trovare una base microbiologica alle patologie extra -orali annesse.

## **Capitolo 1:**

## *Capitolo 1*

### **DISPLASIA ECTODERMICA**

#### **1.1) INQUADRAMENTO STORICO- EPIDEMIOLOGICO**

La Displasia Ectodermica (EDs) comprende un vasto e complesso gruppo nosologico di patologie (67) caratterizzati dall'anomalo sviluppo di due o più strutture di origine ectodermica (6), ma anche di strutture di derivazione mesodermica. Tali anomalie di crescita dell'ectoderma sono dovute a difetti genetici ereditari e quindi non più modificabili.

L'ectoderma é quella parte fetale che durante la gravidanza é preposta alla formazione delle ghiandole esocrine del corpo, ai peli, ai denti, alle unghie e ad alcune parti del sistema nervoso (45).

La letteratura internazionale ha individuato e classificato circa 200 forme differenti di displasia ectodermica (31), 20 delle quali particolarmente comuni ma di cui non è stata data ancora una definizione soddisfacente.

Affinché infatti un disturbo sindromico possa essere inquadrato nella categoria “displasia ectodermica” devono essere presenti almeno due delle seguenti strutture anatomiche alterate: denti, capelli, sopraccigli, ghiandole sudoripare e unghie (6).

Dal momento che la malattia può interessare tutti gli organi che si sviluppano dal foglietto embrionale esterno, le manifestazioni cliniche riscontrabili sono molteplici. Inoltre, considerando che durante il periodo embrionale endoderma, mesoderma ed ectoderma interagiscono tra loro, può verificarsi un elevato range di anomalie causate da mutazioni o da alterazioni di geni codificanti proteine fondamentali per lo sviluppo.

Di conseguenza, oltre all'evidenza clinica di una alterazione strutturale, che permette di inserire il soggetto in una determinata classe sindromica, particolarmente difficile è attribuire ad ogni manifestazione clinica un gruppo specifico di appartenenza in quanto le caratteristiche cliniche dei distretti anatomici vengono valutate soggettivamente senza poterle paragonare a schemi rigidi: ciò significa che sebbene sia relativamente facile

inserire un soggetto all'interno dell'insieme "displasia ectodermica", particolarmente complesso è riuscire a dare allo stesso una più precisa collocazione in relazione ai dati rilevati (forma delle unghie, densità dei capelli, conformazione dei denti, ecc.).

Storicamente i primi dati relativi alla Displasia Ectodermica risalgono al 1793, quando Danz in un suo lavoro riportò il caso di due ragazzi affetti dall'assenza congenita di denti e capelli. Nel 1875, Darwin descrisse come i fenotipi degli annessi epidermici fossero ereditati in modo sesso-specifico in una famiglia intera indiana da gli individui di sesso maschile, i quali presentavano gli stessi segni clinici della malattia (23; 21). Soltanto nel 1923, ad opera di Weech, questa patologia venne identificata come *Displasia Ectodermica*.

La EDs può essere ereditata attraverso tutte le modalità di trasmissione Mendeliana dell'ereditarietà dei caratteri.

Per quanto le cause scatenanti la malattia non si conosce molto, ad oggi si sa che l'origine è genetica; si riconoscono, infatti, forme sia dominanti che recessive legate ad alterazioni cromosomiche del *gene EDA* localizzato sul cromosoma X (circa il 95%), e forme autosomico-recessive e autosomico-dominanti, dovute a mutazioni del gene che codifica per il recettore dell'ectodisplasina (*gene EDAR*), e del gene che codifica per un fattore di modulazione per il complesso ectodisplasina/recettore dell'ectodisplasina (*gene EDARADD*), che comprendono il 5% restante (86).

Essendo la trasmissione recessiva X-linked, solo i maschi possono presentare la forma completa. La malattia viene sviluppata in prevalenza da bambini di sesso maschile, mentre le femmine, emizigoti, possono essere asintomatiche, presentare (fino al 70% dei casi) segni sfumati o anche essere solo portatrici sane.

In relazione al funzionamento delle ghiandole sudoripare si può distinguere la malattia in tre differenti forme: *ipoidrotica* (presenza di ghiandole sudoripare), *anidrotica* (completa assenza di ghiandole sudoripare) ed *idrotica* (normale sviluppo di ghiandole sudoripare).

Fra tutte le forme di EDs, la più comune è la displasia ectodermica anidrotica (EDA o sindrome di CHRIST-SIEMENS-TOURAINÉ), che risulta avere un'incidenza di 1:100.000 nati vivi (83), che tende sicuramente ad aumentare fino al 7:10.000 nati vivi a livello internazionale se si considerano tutte le forme di EDs riconosciute (A.N.D.E.; 42).

La forma anidrotica vanta una ben precisa triade di segni clinici che ne permettono da subito l'inquadramento: ipo-tricosi, ipo-anidrosi e ipo-anodonzia, e che fungono da campanello di allarme per ulteriori indagini mediche (86).

## **1.2) GENETICA: REGOLAZIONE GENICA ED ALTERAZIONE CROMOSOMICHE**

La EDs è una malattia rara, su base genetica, caratterizzata da una serie di anomalie nell'accrescimento di organi o sistemi di differente derivazione embriologica.

Lo sviluppo delle strutture ectodermiche è regolato dalla sequenza di interazioni induttive tra due strati tissutali adiacenti, l'epitelio ed il mesenchima (25). La fisiologica maturazione delle strutture ectodermiche del tegumento è infatti fondamentale per il regolare sviluppo e determinazione delle strutture mesenchimali sottostanti (55).

Il gene responsabile della malattia è stato mappato per la prima volta a livello del cromosoma X nel 1970 ed il continuo interesse a riguardo ha fatto sì che negli ultimi anni si arrivasse ad identificare le basi molecolari delle 30 più comuni forme di displasia, che vedono coinvolti geni implicati nella morfogenesi epiteliale, nella proliferazione, nello sviluppo, e nei meccanismi di adesione e segnalazione cellulare. (47; 34).

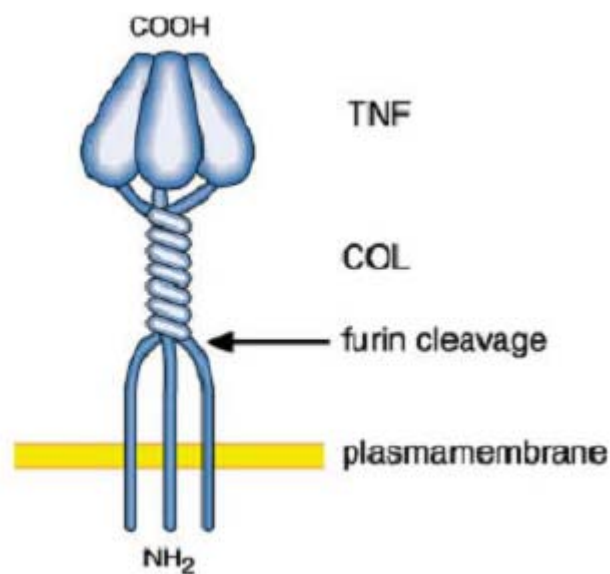
Ed è proprio in relazione alla diversa funzione svolta da questi geni ed alla conoscenze di cui si dispone oggi, che è possibile classificare le diverse forme di displasia ectodermica.

Fra tutte le forme di EDs, la più comune è sicuramente la displasia ectodermica ipoidrotica o anidrotica, o Sindrome di Christ-Siemens-Touraine.

E' una malattia trasmessa con modalità autosomica recessiva, ed essendo legata al cromosoma X risulta avere una penetranza completa soltanto nei soggetti di sesso maschile, che ricevono il gene della malattia da una madre portatrice, la quale solitamente non presenta alcun segno clinico (82).

I soggetti di sesso femminile possono invece presentare manifestazioni cliniche minori o presentare un quadro clinico conclamato; in questo caso la malattia è da attribuire ad un pattern di inattivazione selettiva del cromosoma X portante l'allele *wild-type* (58).

Il gene *EDI*, responsabile della Sindrome di Christ-Siemens-Touraine, è localizzato a livello del cromosoma X in posizione Xq12-q13.1, e codifica per una proteina transmembrana, omotrimerica, denominata ectodisplasina (EDA, OMIM\_224900), coinvolta nella morfogenesi degli annessi cutanei e degli abbozzi dentari durante il periodo embrionale (43; 37). L'ectodisplasina, costituita da ~130 aminoacidi, presenta due isoforme principali, EDA-A1 ed EDA-A2, che differiscono tra loro per la presenza di una coppia aminoacidica e che presentano nella porzione extracellulare una tripla elica di natura collagenica ed un dominio C-terminale, che la rende molto simile da un punto di vista strutturale ai membri della famiglia del tumor necrosis factor (TNF) (27; 12; 21). (Fig.1).



**Figura 1: Struttura dell'ectodisplasina:** Sono visibili il dominio transmembrana, il sito di taglio furinico, il segmento di collagene e la regione di omologia con i membri della famiglia dei TNF (55).

Le forme più comuni di EDs ipoidrotica sono fondamentalmente dovute ad una sostituzione Ist/Tyr in posizione 54 nella sequenza aminoacidica dell'ectodisplasina, sebbene in letteratura diversi studi riportino il coinvolgimento di diversi tipi di mutazioni (44) tra cui quelle a livello del gene *EDAR* e del gene *XEDAR*.

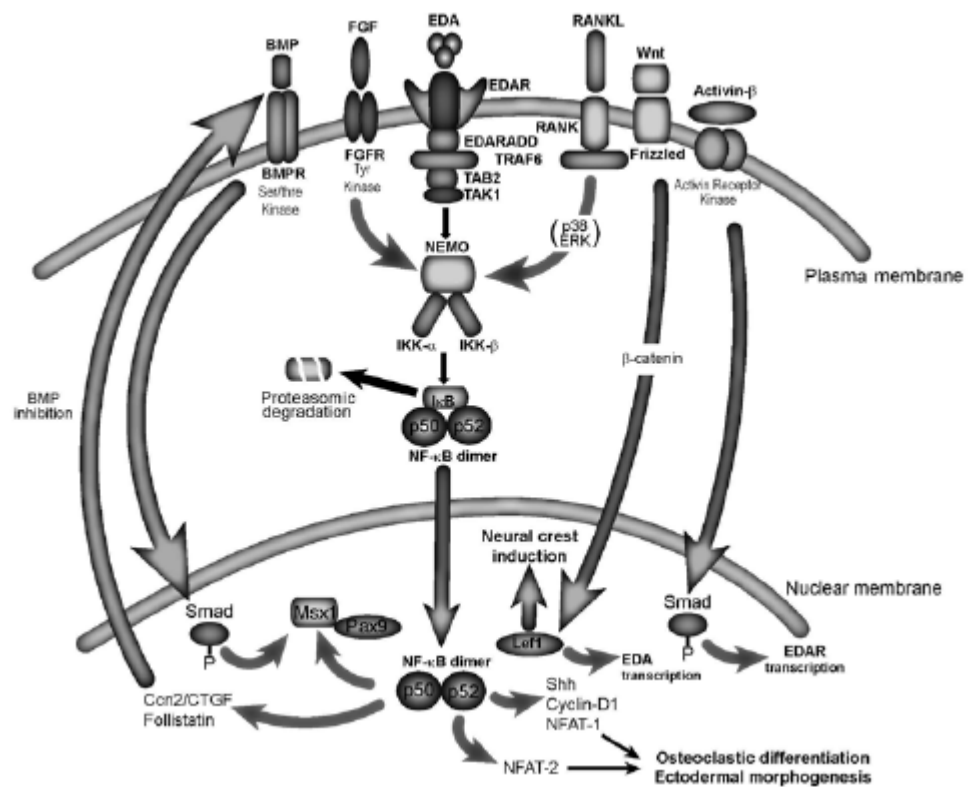
Il gene *EDAR* (*EDA receptor*, OMIM\_604095) è localizzato a livello 2q11-q13 e codifica per una proteina specifica che funge da recettore per l'isoforma A1 dell'ectodisplasina.

Il legame EDA-A1/EDAR innesca la cascata di segnalazioni necessarie al normale sviluppo dei derivati ectodermici.

Mutazioni nel gene *EDAR* sembrano essere responsabili delle forme autosomiche dominanti o recessive di EDs ipoidrotica (56).

Il gene *XEDAR* codifica invece per la proteina che funge da recettore per l'isoforma A2 dell'ectodisplasina.

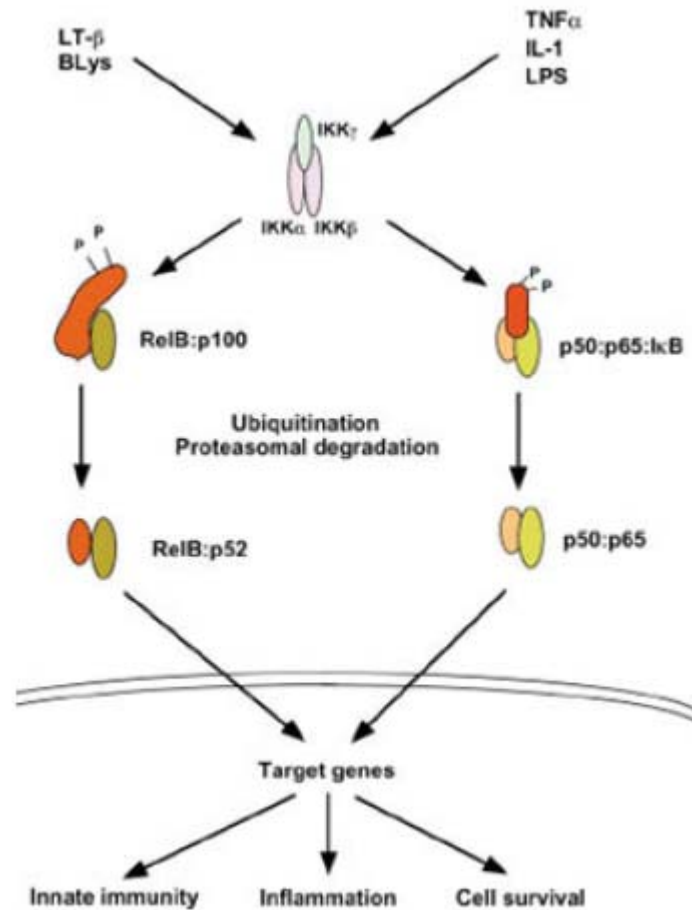
Il legame delle due isoforme di EDA con i rispettivi recettori comporta un'attivazione di questi ultimi, grazie al coinvolgimento di una proteina adattatrice, EDARADD (*adapter EDAR associated protein*, OMIM\_606603), associata ad un "death domain" citoplasmatico e della via di traduzione NEMO/NF- $\kappa$ B (10) che regola i meccanismi di risposta a livello cellulare a diversi stimoli (apoptosi, stimolazione da TNF). (Fig. 2)



**Figura 2: Pathway di segnalazione EDA:** Il legame di EDA al recettore EDAR determina la formazione del complesso EDARADD/TRAF6. L'interazione EDA/EDAR/EDARADD porta all'attivazione del complesso IKK che fosforila I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , ed I $\kappa$ B $\epsilon$ , le quali a loro volta liberano il fattore NF- $\kappa$ B, che migrando nel citoplasma, porta all'attivazione del gene target. In assenza di stimolo, I $\kappa$ B $\beta$  mantiene NF- $\kappa$ B inattivo nel citoplasma, inibendo l'attivazione di geni effettori. (14).



Mutazioni a livello del gene NEMO, e di conseguenza l'attivazione di un pathway di segnalazione alternativo del fattore NF- $\kappa$ B, sono responsabili di una forma di EDs X-linked con immunodeficienza. (Fig. 3)



**Figura 3: Pathway di segnalazione alternativo di NF- $\kappa$ B:** Il lato destro della figura mostra la via classica di attivazione del fattore NF- $\kappa$ B; sulla sinistra è riportato il pathway di attivazione di NF- $\kappa$ B secondo la via alternativa: la chinasi NIK [(NF- $\kappa$ B inducibile chinase, membro della famiglia delle MAP3K] attiva direttamente IKK $\alpha$  che fosforila un precursore di p52, p100, portando alla formazione di eterodimeri (p52-RelB) (33;15;20).

Le forme di EDs idrotica risultano invece associate ad una alterazione nel gene che codifica per le connesine, proteine responsabili della formazione delle gap-junction, importanti nei meccanismi di segnalazione cellulare.

La Sindrome di Clouston ne è un esempio; in questo caso si ha una mutazione a livello della regione pericentromerica del cromosoma 13q, sulla sequenza del *gene GJB6*, che codifica per la connessina-30 (CX-30).

Mutazioni a carico di questo gene sembrano alterare la funzione di CX-30 espressa a livello epidermico, mancanza che in alcuni casi viene compensata dall'azione di altre connesine espresse in altri distretti, ma che in caso non riesca ad essere compensata, si tramuta nella comparsa di sordità di origine autosomica dominante non sindromica e displasia ectodermica (47).

I dati a disposizione sulla struttura e funzione delle proteine codificate dai geni responsabili della malattia ed la conoscenza sui meccanismi legati alla sua trasmissione sembrano spiegare chiaramente la natura eterogenea della EDs ipoidrotica.

Forme di EDs possono anche essere associate a mutazioni che non coinvolgono direttamente i *geni EDA* ed *EDAR*.

Sono stati, infatti, descritti casi di EDs, ad oggi identificabili anche con la diagnosi prenatale, in cui la mutazione responsabile sembra essere localizzata a livello di un gene che codifica per una proteina, la placofillina 1 (PKP1), coinvolta nel meccanismo di adesione cellulare.

I pazienti affetti, in cui tale proteina risulta alterata, mostrano un difetto nell'interazione tra cellule ed una disorganizzazione nella distribuzione dei filamenti di actina, che si tramuta in un quadro clinico specifico, caratterizzato da forte fragilità cutanea, presenza di capelli radi e ridotta sudorazione (53).

Un altro caso di EDs dovuta ad una alterazione in proteine che svolgono un ruolo importante nell'adesione cellulare è la "Margarita Island Ectodermal Displasia" (ED4), un disordine autosomico recessivo, con un quadro clinico

caratteristico, dovuto ad una alterazione del *gene PVRL1*, codificante per la nectina-1, una glicoproteina integrale che si estende nella membrana plasmatica, composta da molecole con domini di superficie correlati agli anticorpi, coinvolta nei meccanismi che regolano l'adesione cellulare, la stabilità e l'integrità e organizzazione della membrana citoplasmatica.

Tra le alterazioni cromosomiche capaci di dare EDs sono state descritte mutazioni nei geni che codificano per proteine coinvolte nella regolazione della trascrizione.

La sindrome di "Ellis-Van Crefeld" è una rara forma di displasia scheletrica autosomica recessiva, dovuta proprio all'alterazione in un gene che codifica per delle proteine con una potenziale attività trascrittassica (73).

Numerose sindromi umane ad eredità dominante sono inoltre da attribuire ad alterazioni nell'espressione di p63, un fattore di trascrizione correlato al *gene TP53*, espresso nell'ectoderma in fase embrionale e nello strato basale del tessuto epiteliale nell'adulto (42).

Anche la Discheratosi Congenita può essere classificata in questo gruppo di patologie, in quanto correlata a mutazioni nella sequenza di due diversi geni, coinvolti rispettivamente in base alla modalità di trasmissione. La forma X-linked è associata ad una mutazione del *gene DKCI*, localizzato appunto sul cromosoma X, che codifica per una proteina, la discherina, con un ruolo importante nella processazione dell'RNA ribosomiale (8).

Geni responsabili di EDs sono anche quelli che codificano per proteine con attività di elicasi, come il *gene RECQL4*, coinvolto nella sindrome di Rothmund-Thomson, che regolano i meccanismi di replicazione e riparazione del DNA (84).

L'elevata conservazione a livello genetico di EDA, EDAR ed EDARADD ha fatto sì che fosse possibile allestire modelli di studio tra i vertebrati, in primis quello sui topi.

I modelli murini di EDA, noti ormai da anni, sono caratterizzati da mutazioni spontanee in geni omologhi di EDA EDAR ed EDARADD.

I topi mutati mostrano, infatti, lo stesso fenotipo “malato” a carico dei distretti ectodermici, con mancanza di denti o alterazioni nella loro forma, assenza di ghiandole sudoripare, ed un’ anormale organizzazione della cellula pilifera. Altre ghiandole come quelle lacrimali risultano fortemente ridotte o del tutto assenti (29; 21; 18; 55).

Alterazioni fenotipiche simili a quelle presenti nel modello murino le si riscontra negli altri modelli animali TRAF6<sup>-/-</sup>. Una mutazione di questo tipo che si traduce in un fenotipo caratterizzato da difetti nei follicoli piliferi con zone di alopecia ed alterazioni a livello ghiandolare (57).

Aberrazioni a carico di altri tessuti di origine ectodermica, quali lesioni della cornea ed infiammazione della congiuntiva oculare, sono state riportate sia in modelli umani che murini (19).

Come noto, EDA ha diverse varianti di *splicing* con la possibilità di identificare diverse isoforme. Quelle funzionali, EDA-A1 ed EDA-A2, sono quasi la totalità (20) e sono in grado di legare due diversi recettori, differendo solamente per due aminoacidi.

Il legame EDA-A1/R porta all’attivazione del fattore NF-kB tramite EDARADD e legame con TRAF6 (20; 55).

Il modello murino di EDA-A1 ma non di EDA-A2 presenta la capacità di indurre un miglioramento fenotipico per i diversi distretti alterati, suggerendo un ruolo nell’inizio della morfogenesi e differenziamento di organi ectodermici.

Sono stati studiati, infatti, modelli murini per la sovraespressione di EDA-A1 rispetto al limite endogeno sotto il controllo di alcuni promotori per cercare di valutare il ripristino del fenotipo *wilde type* (29; 78; 18; 19) e tutti questi studi hanno dimostrato la capacità di EDA-A1 di ripristinare, da solo e sufficientemente, tutti i distretti piliferi e corneali (22).

Dal momento che da un modello di questo tipo risulta ripristinato il fenotipo, si pensa sia possibile che anche le altre isoforme abbiano un ruolo chiave nello sviluppo di derivati ectodermici, magari tramite pathway di segnalazione alternativi.

Un altro recettore coinvolto nella genesi dell'EDs è TROY, membro della famiglia dei tumor necrosis factor receptors (TNFR), espresso anche a livello del Sistema Nervoso Centrale, dove interagisce con un particolare corecettore, Ngr1, reprimendo la rigenerazione assonica (77).

TROY lega l'isoforma A5 di EDA a livello di un ligando specifico,  $LT\alpha$ , coinvolto nella risposta immunitaria con un possibile ruolo anche in caso di infiammazioni. Il legame TROY-  $LT\alpha$  favorisce l'attivazione del pathway NF-kB, potrebbe dunque essere coinvolto nello sviluppo degli annessi ectodermici (36).

### **1.3) CLASSIFICAZIONI DELLE DISPLASIE**

Una prima classificazione delle Displasie Ectodermiche risale al 1994: le distingue in 2 gruppi in relazione alle manifestazioni cliniche (42; 64).

Freire-Maia e Pinheiro distinsero un gruppo A, costituito da 11 sottogruppi, a seconda dei tessuti interessati, cui appartenevano i soggetti con difetti in almeno due delle classiche strutture ectodermiche, quindi capelli, unghie, denti e ghiandole sudoripare, ed un gruppo B, comprendente 4 sottogruppi, in cui rientrano i soggetti presentanti alterazioni a carico di uno solo dei distretti sopra elencati, con però anomalie a livello di orecchie, labbra e palma di mani e piedi (67).

Secondo gli autori si fa fatica a risalire ad una eziologia nota per queste patologie, in quanto le situazioni che potrebbero generarle sono molteplici e di diversa natura; motivo per cui questo tipo di classificazione è stata basata su una distinzione della patologia sulla base dell' ereditarietà dei caratteri:

*Autosomica recessiva (AR)*: Caso nato da un matrimonio consanguineo tra soggetti sani oppure da genitori che presentano lievi manifestazioni della patologia.

*Autosomica dominante (AD)*: Caso in cui la trasmissione si ha da entrambi i sessi dei genitori ad entrambi i sessi della prole.

*X-linked recessivo (XR)*: Caso in cui la patologia è trasmessa da una madre portatrice ai figli, sia maschi che generalmente sono affetti, che femmine, le quali possono presentare segni moderati di malattia.

*X-linked dominante (XD)*: Quando la trasmissione è dimostrata da padre affetto a figlie femmine e da madri affette a metà della prole, indipendentemente dal sesso.

In un secondo momento Priolo e Laganà, valutando i meccanismi biologici alla base della patogenesi delle Displasie Ectodermiche, hanno elaborato due nuovi gruppi di appartenenza, nel tentativo di integrare i dati molecolari e genetici con le caratteristiche cliniche. La classificazione si basa fondamentalmente sulla distinzione dei difetti primari in almeno due derivati ectodermici, da quelli che possono essere ritenuti difetti riportati sporadicamente, poiché per questi ultimi non si può risalire ad un percorso di ereditarietà dei caratteri certo. Il gruppo 1, dunque, comprende soggetti con difetti della regolazione dello sviluppo e nelle interazioni tra epitelio e mesenchima, ed il gruppo 2 include soggetti affetti da patologie con anomalie a carico del citoscheletro e patologie di stabilità cellulare (68).

Le EDs incluse nel gruppo 1 sono caratterizzate dal coinvolgimento dei maggiori derivati ectodermici. La più comune di queste forme è sicuramente la Displasia Ectodermica Anidrotica X-linked.

Il gruppo comprende forme che possono essere trasmesse con modalità differenti da un punto di vista genetico, ma clinicamente simili, caratterizzate da alterazioni a carico del sistema immunitario, che può a sua volta risultare alterato o seriamente compromesso. (68).

Nonostante le forme di EDs catalogate in questo gruppo riscontrino tutte un'alterazione a livello genico, come l'Incontinentia Pigmenti (IP), la EDA con immunodeficienza (EDA-ID), ve ne sono altre da considerare la cui alterazione genica non è stata però ancora riscontrata, ma che in ogni caso presentano un coinvolgimento dei maggiori derivati ectodermici, alterazioni nel sistema immunitario ed a carico del sistema nervoso centrale.

Anche le EDs con un importante interessamento scheletrico, e difetti nel sistema endocrino sono incluse in questo gruppo. (68).

Un'alterata interazione tra ectoderma e mesoderma sembra essere uno dei più importanti meccanismi alla base della patogenesi dell'EDs.

Questa interazione è resa possibile dalla presenza di molecole e di proteine specifiche costantemente coinvolte nel pathway di segnalazione morfogenetico.

Fino ad oggi sono stati descritti due differenti pattern di regolazione di questa interazione, il sistema EDA-A1/DL ed il sistema del gene NEMO. Una variazione di questi due meccanismi segnale può aversi in presenza di un coinvolgimento del sistema di regolazione del Nuclear Factor kappa Beta, nel quale l'azione di NF-kB risulta potenziata.

Il secondo gruppo include tutti quei disordini dovuti ad un'alterazione delle proteine strutturali coinvolte nell'adesione cellulare, nel mantenimento dell'integrità del citoscheletro e della membrana cellulare e quelli di natura più eterogenea, dove comunque i sintomi clinici predominanti sono l'ipercheratosi, il labio-palato-schisi, sordità e degenerazione della retina (es: Sindrome di Clouston disease, ED/skin fragility sindrome) (68).

A differenza delle precedenti, questa classificazione segue l'utilizzo di criteri clinici nell'identificazione delle diverse forme di displasia; approccio questo che risulta fondamentale nella scelta di nuovi geni "chiave" da studiare per la determinazione della malattia.

Soltanto nel 2003, basando su recenti scoperte biochimiche e molecolari, Lamartine propose una nuova classificazione delle Displasie Ectodermiche, distinguendo le varie forme in relazione ai geni coinvolti nella comunicazione e segnalazione intracellulare, nell'adesione cellulare, nella regolazione della trascrizione e nello sviluppo cellulare (47) (Tabella 1)

Disease	OMIM	Inheritance	Causative gene	Protein	Putative protein function
<b>Cell-cell communication and signalling</b>					
Anhidrotic ED (ED1)	305100	XR	<i>EDA</i>	Ectodysplasin	Soluble ligand, activates NF- $\kappa$ B pathway
Hypohidrotic ED (ED3)	129490	AD	<i>DL</i>	EDAR	EDA receptor
ED hypohidrotic	224900	AR	<i>DL</i>	EDAR	EDA receptor
ED hypohidrotic	224900	AR	<i>EDARADD</i>	EDARADD	Interacts with EDAR
Hidrotic ED (ED2, Clouston syndrome)	129500	AD	<i>GJB6</i>	Cx30	Form gap-junctions channels
Palmoplantar keratoderma with deafness	148350	AD	<i>GJB2</i>	Cx26	Form gap-junctions channels
Incontinentia pigmenti type 2	308300	XD	<i>NEMO</i>	IKK-gamma	Regulator of kinase phosphorylating I $\kappa$ B
Hypohidrotic ED /Immune deficiency	300291	XR	<i>NEMO</i>	IKK-gamma	Regulator of kinase phosphorylating I $\kappa$ B
OLEDAID syndrome	300301	XD	<i>NEMO</i>	IKK-gamma	Regulator of kinase phosphorylating I $\kappa$ B
<b>Adhesion</b>					
Margarita island ED (ED4)	225060	AR	<i>PVRL1</i>	Nectin-1	Ig-related cell-cell adhesion molecule
ED/skin fragility syndrome	604536	AR	<i>PKP1</i>	Plakophilin 1	Desmosomal protein
HJMD syndrome	601553	AR	<i>CDH3</i>	P-Cadherin	Calcium dependant cell adhesion molecule Regulation of transcription
Electrodactily ED facial clefting	129900	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
Ankyloblepharon ED (AEC)	106260	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
ADULT syndrome	103285	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
SHFM syndrome	183600	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
Limb-Mammary Syndrome (LMS)	603543	AD	<i>TP63</i>	p63	Transcription factor, forms dimers with p53
Hypoparathyroidism renal dysplasia (HDR)	146255	AD or AR	<i>GATA3</i>	GATA3	Transcription factor
Ellis-Van Creveld syndrome (EVC)	225500	AR	<i>EVC</i>	EVC	DNA binding protein, putative transcription factor
<b>Development</b>					
Withkop syndrome	189500	AD	<i>MSX1</i>	Hox7	Putative homeodomain protein expressed in embryo
SMMCI syndrome	147250	?	<i>SHH</i>	Sonic Hedgehog	Specifies the dorso-ventral polarity of neural tube during development
<b>Others</b>					
Rothmund-Thomson syndrome (RTS)	268400	AR	<i>RECQL4</i>	RecQ protein like 4	Helicase, involved in DNA replication, repair and recombination
Dyskeratosis congenita (DKC)	127550	XR	<i>DKC1</i>	Dyskerin	Component of the telomerase ribonucleoprotein
Marshall syndrome	154780	AD	<i>COL11A1</i>	Collagen type XI, alpha 1	Protein of the extracellular matrix

AD, Autosomal dominant; AR, autosomal recessive; XR, X-linked recessive; XD, X-linked dominant; ?, unknown.

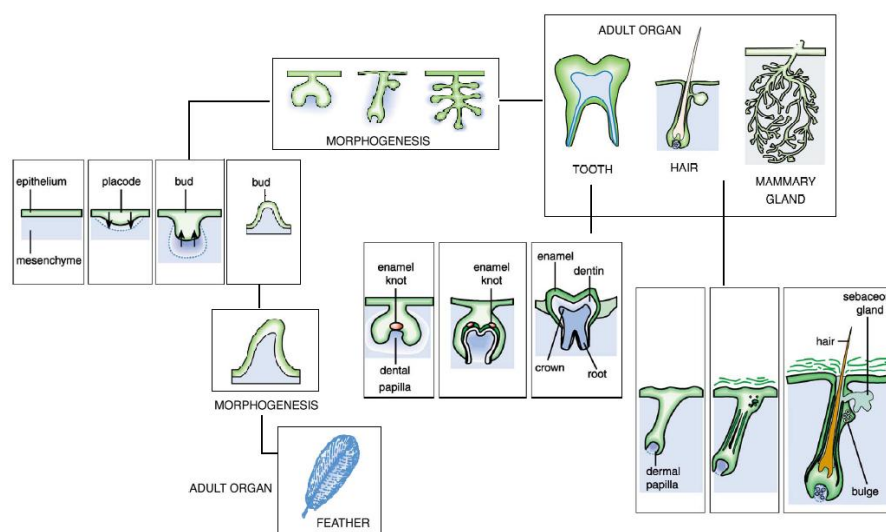
**Tabella 1: Classificazione funzionale delle Displasie Ectodermiche:** La tabella riporta i geni e le diverse proteine funzionali le cui alterazioni sono associate alle diverse forme di EDs (47)



## 1.4) MANIFESTAZIONI CLINICHE

La caratteristica principale della Displasia Ectodermica sono le alterazioni a carico degli annessi ectodermici (42). Come riportato da Priolo et al., 2000 e Kupietzky e Houpt, nel 1995, le diverse forme di malattia si identificano tramite peculiari alterazioni a carico soprattutto di capelli, peli unghie e ghiandole sudoripare.

Lo sviluppo degli annessi ectodermici ha inizio con un locale ispessimento epiteliale, che prende il nome di placca ectodermica. La formazione di questa placca è accompagnata dalla condensazione delle cellule mesenchimali sottostanti volte a formare una papilla che protrude all'interno o all'esterno del mesenchima. Successive variazioni morfologiche dell'epitelio e del mesenchima porteranno alla forma e dimensione finale dell'organo. (66; 70). (Fig. 4).



**Figura 4: Sviluppo degli annessi ectodermici:** Lo sviluppo degli annessi ectodermici a partire dall'epitelio di superficie è regolato da interazioni tra quest'ultimo ed il mesenchima sottostante, che darà poi la forma finale all'organo. Nei primi stadi di sviluppo si assiste alla formazione di una placca (placode) e di una gemma (bud) che protrude all'interno o all'esterno del mesenchima portando alla formazione di una papilla dermica o dentale, a seconda dell'organo in sviluppo. (55; 66)

La morfogenesi e lo sviluppo dei vari annessi ectodermici sono processi altamente regolati da un punto di vista genico. I geni coinvolti favoriscono la trasmissione e l'interazione reciproca induttiva tra epitelio e mesenchima, operano dunque come morfogeni nei diversi stadi della vita embrionale (67). Nella formazione della placca intervengono anche varie molecole segnale che svolgono importanti funzioni nelle interazioni cellula-cellula, o in altri steps dell'embriogenesi (76; 70; 66).

La precisa sequenza temporale con cui questi meccanismi avvengono non è ancora del tutto chiara, ma sembra contenere la giusta chiave di lettura sulla disparata natura delle EDs.

Le forme più comuni di EDs sono rappresentate dalla Displasia Ectodermica Ipoidrotica e dalla forma di Anidrotica.

Circa il 90% dei soggetti affetti è di sesso maschile, dal momento che la forma più frequente viene ereditata con modalità autosomica-recessiva e risulta X-linked.

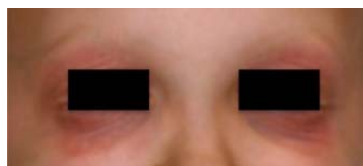
I maschi presentano dunque segni evidenti di malattia, mentre le femmine, che possono essere portatrici di un singolo gene alterato, possono, qualora affette, potrebbero presentare segni blandi di malattia.

I pazienti affetti da displasia ectodermica presentano una serie di caratteristiche cliniche particolari, quali cute secca, sottile ed ipopigmentata, con cheratosi ed eczemi, che nel soggetto neonato sfocia in una forma desquamativa della pelle, che si manifesta maggiormente a livello del volto, di mani e piedi. (34; 2) (Fig. 5).



**Figura 5: Caratteristiche cliniche di pazienti con EDs:** I pazienti affetti presentano cute secca (A e B), sottile ed ipopigmentata (C), con cheratosi ed eczemi (E), che nel possono sfociare in una forma desquamativa della pelle, che si manifesta maggiormente a livello del volto, di mani e piedi (D). (26).

La cute che circonda la zona periorbitale appare iperpigmentata, grinzosa, con rughe particolarmente evidenti, tanto che il soggetto appare precocemente invecchiato. A causa della ridotta presenza di ghiandole lacrimali, gli occhi possono sviluppare secchezza e congiuntivite bilaterale (52; 71) (Fig. 6).



**Figura 6: Secchezza cutanea periorbitale in paziente con EDs:** La cute secca e grinzosa conferisce al paziente il caratteristico aspetto dell'invecchiamento precoce (*Dip. Scienze Odontostomatologiche-Servizio Odontoiatria per Disabili, Bologna*)

Per quanto riguarda il distretto cefalico, i soggetti affetti presentano una *facies* caratteristica, con fronte pronunciata e margine sovraorbitario prominente, labbra protruse e molto spesse (74), naso piccolo con la caratteristica forma “a sella” (71) ed i capelli, generalmente biondi, con frequenti ipotricosi (30) e segni di alopecia totale o parziale, in relazione alla funzionalità e presenza dei follicoli piliferi (13). (Fig. 7)



(Koerner, 2006)

**Figura 7: Caratteristiche fenotipiche dei pazienti con EDs :** I pazienti affetti da displasia ectodermica presentano una serie di caratteristiche cliniche particolari che rendono la patologia facilmente distinguibile: fronte pronunciata e margine sovraorbitario prominente, labbra protruse e molto spesse, naso “a sella”, capelli, generalmente biondi, con frequenti ipotricosi e segni di alopecia totale o parziale, in relazione alla funzionalità e presenza dei follicoli piliferi.

Le unghie sia delle mani che dei piedi possono essere distrofiche , ipertrofiche con difetti di cheratinizzazione, scolorite o frammentate, fortemente soggette a frattura e ad infezioni (2).

Le ghiandole sudoripare sono ipoplastiche o alle volte completamente assenti, causando gravi problemi di termoregolazione, quali intolleranza al calore e frequente febbre alta a causa della ridotta sudorazione (17; 75) le ghiandole sebacee possono essere assenti o più frequentemente ridotte di numero, il che si traduce in un maggior rischio di sviluppare irritazioni cutanee (5) le ghiandole della mucosa orale e nasale, ghiandole salivari e ghiandola mammaria possono essere ipotrofiche o assenti (34).

L'assenza di ghiandole mucose nel tratto respiratorio e gastrointestinale può provocare frequenti infezioni a carico dei distretti interessati.

Altri segni clinici possono includere disturbi nasali, rinite atrofica, responsabili della comparsa di croste e secrezioni fetide e conseguentemente della possibilità di incorrere in infezioni secondarie da stasi di muco a livello dei seni nasali e paranasali, faringite cronica, dovuta ad una scarsa lubrificazione delle corde vocali, episodi di asma ricorrente, epistassi, perdita di udito dovuto ad accumulo di cerume nel canale uditivo e diminuzione di fluidi corporei, tra cui iposalivazione.

Talvolta si verificano episodi di ritardo mentale che ricorrono in seguito a fenomeni di ipertermia ma lo sviluppo mentale di solito avviene normalmente (45).

Le ghiandole salivari possono mostrare alterazioni infiammatorie, aplasia o ipoplasia del parenchima ghiandolare, con conseguente xerostomia (7), il che predispone il soggetto alla patologia cariosa e parodontale, a sviluppare difficoltà nella fonazione, masticazione e deglutizione, caratteristiche accentuate dall'ipotonicità dei muscoli masticatori, derivata a sua volta da un deficit nello sviluppo dello strato mesenchimale e dall'agenesia dentale (11).

Nei soggetti affetti da Displasia Ectodermica sia la dentatura decidua che quella permanente sono notevolmente compromesse. Il livello di compromissione si manifesta in misura uguale sia nei maschi che nelle femmine, sebbene nei maschi abbia una prevalenza più alta.

Infatti, nell'ambito della popolazione generale, l'ipopdonzia sembra essere molto più frequente dell'oligodonzia ed anodonzia (48).

Nei soggetti affetti da EDs, invece, circa il 25% dei bambini presenta anodonzia, mentre il 75% è affetto da oligodonzia (16) che risulta oltretutto associata alle forme a trasmissione dominante o legate al cromosoma X. (81).

In particolare, i maschi affetti presentano agenesia della maggior parte dei denti decidui e permanenti, mentre le femmine eterozigoti presentano una maggiore frequenza di agenesia, ma di grado nettamente inferiore rispetto ai maschi affetti, indifferentemente dal coinvolgimento dell'arcata mandibolare o mascellare (49).

Altri studi riportati in letteratura, mostrano però come il numero medio di elementi mancanti possa essere maggiore nella mandibola rispetto alla mascella (28; 16; 69).

I denti assenti con maggiore frequenza, nell'arcata mascellare, risultano essere gli incisivi laterali, secondi molari e premolari, mentre gli incisivi centrali, i canini e i primi molari mostrano una maggiore tendenza all'agenesia; nell'arcata mandibolare, invece incisivi, secondi premolari e molari raramente risultano sviluppati, mentre i canini ed i primi molari sono presenti in molti pazienti. In particolare, l'agenesia più frequente è quella dell'incisivo laterale superiore, seguito dal secondo premolare inferiore e ciò differisce da quanti accade nell'ambito della popolazione generale, dove l'agenesia più frequente risulta essere quella del secondo premolare mandibolare seguito dall'incisivo laterale mascellare. In entrambi i mascellari le agenesie sono osservate più frequentemente nel lato sinistro, dato riscontrato anche nella popolazione generale. (69) (Fig. 8).



(Prager, 2006)

**Figura 8: Anomalie del cavo orale nell' EDs:** Quadro tipico di oligodontia del cavo orale di un paziente di 9 anni affetto da Displasia Ectodermica.

Sia le femmine portatrici che i maschi affetti presentano una frequenza molto elevata di anomalie di forma rispetto ai controlli. I denti permanenti appaiono di dimensioni più piccole e quando presenti molto spazati gli uni con gli altri (54; 16; 51).

I soggetti affetti da EDs presentano, inoltre, alterazioni strutturali craniofacciali ed anomalie di numero e forma a livello dentario, che rendono l'identificazione della malattia di facile approccio (20; 42; 72).

Le anomalie facciali sono tanto più accentuate quanto più severa è l'ipodonzia (72). Diversi autori sostengono proprio che, molto spesso, la diagnosi di EDs venga avanzata sulla base della forma e del numero di denti presenti nelle arcate (52). Si parla, infatti, di ipodonzia per indicare l'assenza di uno o pochi elementi dentali, e di oligodonzia per indicare l'assenza di almeno sei elementi dentali e di anodonzia per indicare l'assenza totale dei denti.

Le anomalie di forma possono coinvolgere sia la corona che la radice dell'elemento dentario.

Uno studio condotto da Lexner nel 2007 distingue le anomalie che coinvolgono direttamente la radice in tre diverse tipologie, in relazione alla conformazione della radice stessa, e descrive come anomalia di forma più comune quella caratteristica di forma "conoide" dell'elemento dentario. I denti maggiormente soggetti a questo tipo di anomalia sono gli incisivi, i canini e talvolta i premolari; meno frequente e che interessa soprattutto gli incisivi è la caratteristica forma affusolata (tapared) (49) (Fig. 9)



**Figura 9: Caratteristica forma "conoide" dell'elemento dentario in caso di EDs:** I denti posteriori hanno in genere dimensioni più piccole, con cuspidi ridotte sia in numero che forma; i denti permanenti appaiono di dimensioni più piccole e, quando presenti, molto spazati gli uni con gli altri.

I denti possono presentare anomalie oltre che nella componente ectodermica, che si traducono fondamentalmente in una ipoplasia dello smalto, anche in quella di origine mesodermica, ovvero la dentina.

Anomalie di forma coinvolgono indistintamente sia l'arcata mandibolare che quella mascellare, sebbene l'arcata inferiore mostra una incidenza minore.

Anche l'eruzione dentaria in questi pazienti risulta ritardata; in molti bambini i denti erompono in età avanzata, a circa 5 anni, a causa di un ritardo nel processo di mineralizzazione (88). Molto frequente è anche l'inclusione dentaria, che coinvolge principalmente canini e secondi molari decidui e di solito accompagna l'agenesia degli adiacenti incisivi laterali e secondi premolari permanenti.

Dal punto di vista fisiologico, i denti sostengono la crescita ossea grazie al processo di riassorbimento ed apposizione sollecitato dal legamento dento-alveolare; l'assenza dei denti e l'atrofia ossea portano, pertanto, ad una perdita della struttura normale del viso, che di conseguenza risulta notevolmente ridotto nello sviluppo verticale dei seni mascellari. (80; 24).

L'assenza dei denti determina anche la mancata formazione dei processi alveolari, di conseguenza le creste alveolari nelle aree in cui sembra mancare l'elemento dentario, risultano atrofiche. (5) (Fig. 10)



**Figura 10: Atrofia gengivale in un paziente con EDs:** La parziale o totale assenza dell'elemento dentario comporta la mancata formazione dei processi alveolari, di conseguenza le creste alveolari nelle aree in cui sembra mancare l'elemento dentario, risultano atrofiche. (Dip.Scienze Odontostomatologiche-Servizio Odontoiatria per Disabili,Bologna)



Se da un lato la mancata crescita alveolare determina un incremento nella distanza libera intraocclusale che favorisce il posizionamento dei denti artificiali, dall'altro la ridotta secrezione salivare comporta una maggiore difficoltà per il soggetto di ritenzione della protesi, che attualmente sembrano essere l'unica soluzione nel trattamento odontostomatologico per questi pazienti.

Le anomalie dentarie rappresentano, dunque, una delle menomazioni più gravi a cui il paziente può essere soggetto, in quanto creano un forte disagio sia dal punto di vista funzionale, inducendo gravi disagi nella masticazione, e nella fonazione, che psicologico, legato principalmente ad un fattore estetico, in quanto la *facies* caratteristica della malattia induce il paziente, soprattutto se in età evolutiva, ad avvertire maggiormente la differenza fisica tra se stesso ed i coetanei.

Risulta essere questo il motivo principale per cui oggi risulta di primaria importanza diagnosticare la malattia precocemente, al fine di trattare questo tipo di anomalie in tempi rapidi, per facilitare il paziente non solo nelle normali azioni quotidiane, quali l'assunzione di cibo, ma anche nei rapporti sociali.

### **1.5) DIAGNOSI PRE E POST NATALE**

Sebbene la letteratura fino ad oggi abbia raccolto numerose informazioni su quelle che sono le caratteristiche principali delle forme di Displasia Ectodermica più comuni, è anche vero che trattandosi di una patologia estremamente eterogenea, si fa fatica ad arrivare ad una definizione clinica soddisfacente (31). Questo rende estremamente difficile stabilire quelli che dovrebbero essere i criteri di inclusione certi che permettano di discriminare un paziente affetto da una EDs da uno non affetto o affetto da un'altra patologia.

La Displasia Ectodermica difficilmente viene diagnosticata alla nascita proprio a causa della difficoltà o dell'impossibilità di riconoscere la patologia sulla base delle caratteristiche cliniche.

Spesso la diagnosi viene effettuata mesi più tardi, quando il bambino manifesta accessi febbrili elevati senza cause scatenanti evidenti.

L'utilizzo di linee guida specifiche permetterebbe, dunque, di diagnosticare in tempi rapidi la malattia in maniera certa, di erogare livelli uniformi di assistenza, di monitorare efficacia ed efficienza delle prestazioni, e non ultimo, di facilitare la raccolta dati ed il circuito di informazioni ai genitori, consentendo loro di fare una scelta ponderata sulla situazione e sulla possibilità di un aborto terapeutico (52).

La diagnosi precoce dell'EDs dovrebbe essere fatta o nel periodo pre-natale o al più presto dopo la nascita, al fine di evitare complicanze che mettono in pericolo la vita del bambino, per la prevenzione dei colpi di calore e la messa in atto di un adeguato follow-up.

Si tratta di una diagnosi sostanzialmente clinica, sebbene gli esperti abbiano a disposizione diversi metodi, alcuni semplici ed immediati, altri un pochino più complessi, da utilizzare a seconda del momento in cui si decide di fare diagnosi.

In epoca pre-natale i test maggiormente utilizzati si basano soprattutto sull'analisi del linkage genetico mediante l'utilizzo di polimorfismi di frammenti di restrizione, in cui viene identificato il gene o i geni mutati nel DNA del soggetto in analisi.

Essendo questa una tecnica particolarmente invasiva viene utilizzata soltanto nei casi in cui il rischio di malattia sul feto è molto elevato.

Vi è la possibilità di fare diagnosi anche mediante un'endoscopia diretta sul feto, che permetta di valutarne lo sviluppo tissutale (3). Unico limite di questo esame è che per avere una certa attendibilità deve essere eseguito dopo la 20<sup>a</sup> settimana di gestazione, in quanto solo da questo momento si sviluppano anche i follicoli piliferi e le ghiandole sudoripare, visibili mediante un esame istologico di biopsia cutanea.

La diagnosi post-natale viene invece effettuata nei primissimi giorni dopo la nascita del feto, basandosi fondamentalmente su quello che può essere definito "esame obiettivo" sulla situazione del paziente.

Vengono, infatti, valutate le ipertermie non associabili a cause note e la presenza di anomalie fortemente orientative nella genesi dell'elemento dentario, soprattutto per quello che riguarda i denti decidui (71), mediante una ortopantomografia computerizzata.

Può essere effettuata un'analisi del capello, che risulterà al microscopio elettronico a scansione fragile e sottile ed una valutazione dell'attività funzionale delle ghiandole sudoripare, mediante la determinazione della concentrazione di cloruro di sodio nel sudore. Quest'ultima viene considerata una tecnica molto delicata e poco invasiva, che permette oltretutto di procedere con una diagnosi differenziale tra la forma di displasia idrotica ed anidrotica, la seconda delle quali risulta deficitaria in termini di sudorazione.

L'analisi molecolare, in realtà, può essere utilizzata anche in epoca post-natale, per meglio distinguere le varie forme di displasia a trasmissione autosomica da quelle X-linked, al fine di identificare anche i soggetti di sesso femminile portatori della mutazione.

In uno scenario di questo tipo la mancata eruzione dei denti decidui può fungere da campanello d'allarme per la diagnosi di sospetto di Displasia Ectodermica, soprattutto quando le alterazioni del cavo orale sono accompagnate da un quadro clinico caratteristico (71).

L'analisi dei tessuti dentari può essere effettuata indistintamente tra il periodo pre e post-natale, ed evidenzia in modo particolare quelle che sono le anomalie di forma dell'elemento dentario. L'eventuale assenza dei germi dentari, senza distinzione di forma e localizzazione, se effettuata nel periodo pre-natale, deve cadere dopo la 19° settimana di gestazione e cioè dopo il processo di mineralizzazione dei tessuti.

## **1.6) APPROCCIO ODONTOSTOMATOLOGICO**

I pazienti affetti da EDs necessitano di un approccio specialistico multidisciplinare in grado di affrontare la patologia su diversi fronti, dall'inquadramento diagnostico alla gestione della vita del paziente, che deve essere resa qualitativamente migliore (40).

E' infatti fondamentale fare in modo che questi piccoli pazienti si sentano nel contesto sociale il più "normali" possibile.

Il normale sviluppo intellettuale e la buona aspettativa di vita che questi pazienti mostrano giustifica il forte interesse da parte del clinico per la cura del loro status psico-fisico, indubbiamente influenzato dall'estetica.

L'aspetto fisico crea un forte impatto negativo sull'autostima dei pazienti displasici, il che si traduce in uno squilibrio nello sviluppo delle interazioni sociali del bambino, che diventano sempre più significative con il passare degli anni, senza considerare lo stereotipo che questi bambini si trovano ad affrontare che tende a correlare una ridotta intelligenza a caratteristiche facciali insolite (39; 61).

La riabilitazione risulta dunque fondamentale per aiutare il bambino nella crescita da un punto di vista psico-emotivo; è da attuare il prima possibile, 2-3 anni per i pazienti collaboranti, al fine di prevenire l'isolamento del paziente e favorirne l'integrazione sociale, cercando in tutti i modi di non travisare l'effettiva aspettativa sul risultato ultimo del trattamento, che nel paziente deve rimanere abbastanza realistica.

La riabilitazione protesica sembra pertanto essere la scelta migliore, sebbene non quella di più facile approccio, dal momento che ogni singolo paziente richiede un trattamento complesso, a causa degli innumerevoli deficit che la patologia comporta.

Nella gestione terapeutica dei pazienti con EDs importantissimo è evitare condizioni di ipertemia, indotte dallo scarso o assente sviluppo e funzionamento delle ghiandole sudoripare, che potrebbero susseguirsi a stati di agitazione del bambino.

Tutte le protesi sono provviste di elementi dentari compatibili con l'età del paziente, in resina o ceramica (51).

In relazione al quadro clinico, il paziente può andare incontro al trattamento con protesi parziale, fissa, di solito provvisoria, o rimovibile, o con protesi totale, supportata da impianti o da supporti mucosi in relazione al grado di edentulismo del soggetto (41). Qualora in arcata fossero presenti denti di forma conoide, questi vengono restaurati ed utilizzati come abutments per protesi parziali, favorendo oltre che l'ancoraggio della protesi e di conseguenza la funzionalità, anche l'estetica.

Nell'applicazione delle protesi è importantissimo considerare l'età del paziente; alcuni Autori, infatti, sconsigliano sin dall'inizio l'utilizzo di protesi fisse a favore di quelle rimovibili, parziali e totali, in quanto a causa della precocità con cui comincia il trattamento e considerata la bassa età anagrafica del paziente, bisognerà considerare nel tempo l'ipotesi di rimodellamento della protesi in base alla struttura ossea e cranio facciale del paziente (32; 39; 63), almeno finchè non sarà possibile il trattamento impiantare (79; 1; 35).

Con il passare degli anni, sulle nuove protesi vengono montati progressivamente i denti permanenti al posto di quelli decidui, simulando la perdita fisiologica dell'elemento dentario. Il continuo rimaneggiamento delle basi ossee, inoltre, costringe a ripetute ribasature delle protesi, tanto che oggi per ovviare a questo problema si preferisce usare delle protesi munite di viti centrali di espansione che ne consentano il continuo modellamento.



**Figura 10: Protesi removibile con viti centrali di espansione:** Non potendo prevedere i picchi di crescita ossea del paziente, è consigliato allargare le viti ogni quarto di giro alla settimana, compensando il diastema creato dall'apertura con la ribasatura in silicone ogni due mesi circa.

Questo tipo di riabilitazione comporta una conoscenza ottimale da parte del clinico sulla crescita e sviluppo osseo dei pazienti stessi, sulla quantità di osso disponibile e sulla eventuale possibilità di modificare elementi dentari conoidi già presenti.

Il confezionamento di una protesi corretta ed i buoni risultati della riabilitazione dipendono tutto sommato da molteplici fattori, quali la presenza di un paziente collaborante e la giusta tecnica di approccio al paziente stesso da parte dell'odontoiatra. E' infatti da preferire un tipo di approccio "tell-show-do" alla sedazione, in quanto, sebbene più impegnativo, favorisce una migliore collaborazione del paziente, che di conseguenza si fida di più.

Dopo il trattamento, infatti, i pazienti sembrano anche più motivati a mantenere un buon livello di igiene orale.

In uno scenario del genere è importantissimo che i genitori comprendano bene le procedure ed i risultati del trattamento, al fine di favorire verso il bambino una sorta di "contenzione dolce" (59).

Il bambino deve essere fortemente motivato a portare le protesi abitualmente durante la giornata, eccetto la notte, a maneggiarle e pulirle con cura (65) e ad occuparsi della propria igiene orale, in modo da usufruire del beneficio delle protesi il più a lungo possibile.

Il mantenimento di un buon livello di pulizia del cavo orale aiuta il paziente nel prevenire l'insorgenza di tutta una serie di patologie di natura cariosa e parodontale.

Lo stato di salute orale dei pazienti affetti da ipodonzia è un campo che ancora oggi non risulta completamente studiato. Ciò non toglie che ci sia in letteratura l'evidenza di come un'igiene orale migliore si traduca in una minore predisposizione alla patologia cariosa, soprattutto in pazienti con un quadro di ipodonzia correlato alla distanza tra i vari elementi dentari (60)

Diversi studi riportano anche un'associazione tra ipodonzia e difetti nello smalto, soprattutto se correlata ad un quadro di ipodonzia severa con patologie sistemiche annesse (60; 4).

Studi epidemiologici sullo stato di salute orale in pazienti in età evolutiva condotti in diverse parti del mondo mostrano differenti modelli di malattia. L'appartenenza ad una specifica etnia sembrerebbe influenzare parecchio le condizioni di salute orale gengivale e la predisposizione alla patologia cariosa (9; 50).

Uno studio condotto da Wong e suoi collaboratori, nel 2005, su pazienti cinesi in età evolutiva, affetti da ipodonzia severa, mostra come non ci siano, tutto sommato, sostanziali differenze tra il livello di salute intra ed extra-orale nel gruppo di studio, confrontando i risultati ottenuti con quelli di un gruppo controllo sano, di pari età; la patologia cariosa sembra avere una bassissima prevalenza per entrambi i gruppi, sia nella dentizione decidua che in quella permanente e la metà dei soggetti coinvolti nello studio non sembra mostrare particolari disturbi di tipo infiammatorio a carico dell'apparato gengivale (85).

Alcuni Autori hanno dimostrato, però, come la suscettibilità alla carie ed all'infiammazione del tessuto gengivale non sia omogenea in tutti i pazienti affetti da EDs, ma che risultino maggiormente a rischio i pazienti affetti da ectrodattilia, in quanto, a causa di movimenti limitati nell'uso delle mani, manifestano proprio una maggiore difficoltà nella pulizia quotidiana del cavo orale.

In particolare, questi pazienti possono presentare xerostomia, fessure profonde sulla superficie linguale, con una particolare predisposizione all'accumulo di placca batterica ed alle gengiviti, dovute all'aumento di tessuto cicatriziale a causa di interventi chirurgici ripetuti, o all'utilizzo di apparecchi ortodontici e protesi dentarie, ed una elevata suscettibilità alla candidosi, soprattutto se vi è associato uno stato di importante immunocompromissione del paziente stesso (62).



## **Capitolo 2:**

## *Capitolo 2*

### **SINDROME DI DOWN**

#### **2.1) INQUADRAMENTO STORICO-EPIDEMIOLOGICO**

La Sindrome di Down (SD) è considerata la sindrome cromosomica più frequente, la cui causa principale risulta essere il ritardo mentale.

La SD non può di certo essere considerata una malattia di recente comparsa.

La prima descrizione di un bambino affetto, presumibilmente, da Sindrome di Down, risale ad Esquirol, nel 1838.

In realtà, la storia della SD nasce nel 1866 quando il medico britannico John Langdon Down (1828-1896), da cui tale sindrome eredita il nome, iniziò a prodigarsi nello studio e la cura di bambini colpiti ritardo mentale, con osservazioni dirette e confronti tra i vari pazienti.

In particolare, egli focalizzò la sua attenzione su quei soggetti che presentavano caratteristiche fenotipiche comuni, quali pieghe epicantiche delle palpebre, tratti del viso schiacciati, solchi palmari insoliti, ipotonia muscolare e bassa statura (Fig.1) distinguendo, sulla base di questi criteri, i bambini con ritardo in “cretini”(affetti da ipotiroidismo) e “mongoloidi”, per la somiglianza che egli notò con gli abitanti della Mongolia, ipotizzando inoltre che la comparsa della sindrome potesse essere in qualche modo associabile alla regressione ad un ceppo etnico mongolico.

Ipotesi che venne prontamente respinta dagli studiosi, che nel 1960 deprecarono l'utilizzo del termine “mongoloide” per definire il particolare aspetto di questi soggetti, e si cominciò a parlare di “Sindrome di Down”.



**Figura 1: Segni clinici caratteristici del volto, mani e piedi:** I pazienti affetti da SD mostrano brachicefalia, il ponte nasale piatto, un naso piccolo, il corto collo ed ampio, un' aumentata piega nucale, le orecchie piccole e displastiche. A livello degli arti è visibile un ampio divario tra l'alluce ed il secondo dito dei piedi ed una singola piega, formata dalla fusione dei due pieghe palmari, che si estende attraverso il palmo della mano. Nei soggetti con SD frequente è la clinodattilia, cioè la curva del quinto dito ("mignolo") verso le adiacenti quattro dita della mano.

La patogenesi di SD risulta associata all' esistenza nel genoma di un cromosoma 21 sovranumerario, per cui il soggetto evidenzia la presenza di 47 cromosomi per cellula anziché 46 (29).

Nel 1959 Lejeune, Gautier e Turpin, indipendentemente l'uno dall'altro, trovarono un'associazione tra la presenza di un cromosoma 21 sovranumerario e la Sindrome di Down (44).

Successivamente, nel 1974, Nebuhr, suggerì che il genotipo della Sindrome di Down, fosse prodotto dalla duplicazione di una sola parte della banda q22 del cromosoma 21, che rappresenta una metà del braccio lungo del cromosoma (55).

La trisomia 21 (Ts21) o Sindrome di Down è a tutt'oggi la più comune aneuploidia umana compatibile con la vita. E' considerata la causa genetica più frequente di ritardo mentale associato a problematiche mediche di varia natura (79). E' una sindrome estremamente diffusa, a livello mondiale ogni anno nascono circa 220.000 bambini con Sindrome di Down; l'incidenza della sindrome è 1/650 ogni mille nati (59).

Attualmente in Italia circa un bambino su 700 nasce affetto da SD (60).

L'epidemiologia ha mostrato cambiamenti significativi negli ultimi 20 anni. L'aumento della natalità nelle donne di età più avanzata verificatosi negli ultimi 15 anni avrebbe determinato una frequenza superiore delle nascite di bambini con SD, ma il ricorso alle interruzioni volontarie di gravidanza (IVG) successive alle diagnosi prenatali con amniocentesi ha ridotto il numero delle nascite di bambini con Ts21 rispetto agli anni passati (si stima che senza l'influenza delle IVG selettive i bambini nati con SD sarebbero 850-900 ogni anno). Nonostante la tendenza alla diminuzione delle nascite di bambini con SD per effetto delle IVG selettive, l'aumento della sopravvivenza dei soggetti con Ts21 fa sì che il numero delle persone con SD sia in costante crescita.

L'aumento della sopravvivenza dei soggetti affetti da trisomia 21 è sostanzialmente legato al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie, all'uso di antibiotici, ai progressi della chirurgia (cardiochirurgia in particolare), che hanno consentito una aspettativa di vita attuale per le persone Down di 55 anni. L'aspettativa di vita attuale è molto elevata se paragonata a quella di 9 anni nel 1929 e di 12 anni nel 1949 (10; 28).

Il tasso di sopravvivenza oltre il primo anno di vita ha subito un particolare incremento e da recenti statistiche si è evidenziato che la sopravvivenza a 10 anni sfiora l'85%.

L'effetto dell'età della madre come fattore di rischio per la nascita di figli affetti da trisomia 21 è stato descritto fin dal 1933.

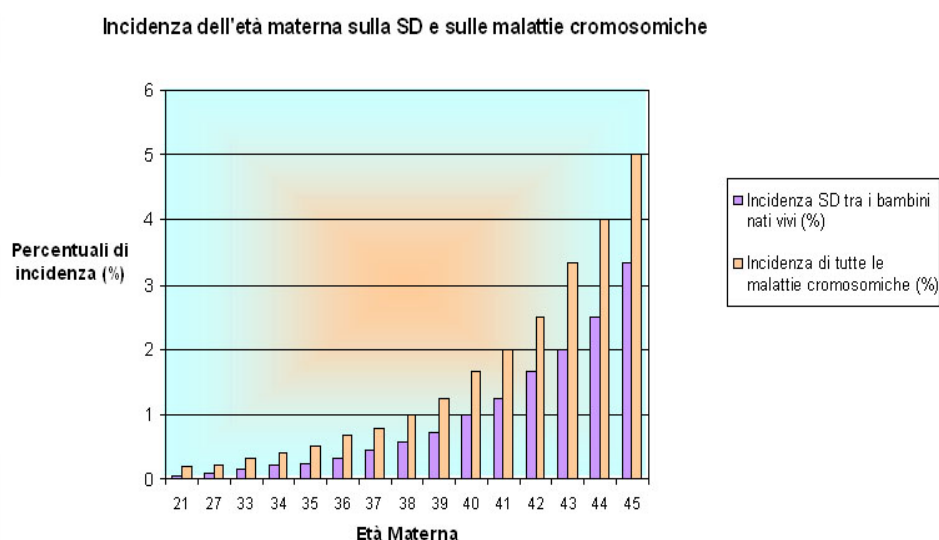
Esaminando 965 amniocentesi, Ferguson, Smith e Yates (1984) conclusero che il numero di casi di Ts21 aumentava drammaticamente oltre i 35 anni di età della madre. Studi demografici hanno dimostrato come il numero di figli nati da genitori di età superiore ai 35 anni sia raddoppiato negli ultimi 20 anni (20).

Questo aumento dell'età genitoriale ha una forte ripercussione sulla salute pubblica perché vi è un incremento del rischio di concepimento di bambini con anomalie genetiche.

Saltorelli *et al.*, hanno ipotizzato che, con l'aumentare dell'età, i meccanismi che permettono al corpo materno di riconoscere ed eliminare con aborto spontaneo un feto portatore di anomalie cromosomiche risultino meno efficaci e che nello sperma di uomini anziani il numero di anomalie cromosomiche sia significativamente aumentato (70).

In uno studio pubblicato da Malini e Ramachandra nel 2006 si ipotizza una importante influenza dell'avanzata età della nonna materna al momento del concepimento della figlia come ulteriore fattore di rischio nel concepimento di feti affetti da SD (49).

La possibilità di concepire un bambino affetto da SD aumenta con l'aumentare dell'età della madre e cresce in maniera evidente dopo i 35 anni. (Fig.2)



**Figura 2: Correlazione tra l'età materna ed il rischio nelle nascite di bambini affetti da SD (72)**

Il ruolo dell'età paterna nel concepimento di bambini affetti dalla sindrome non è stato ancora chiaramente definito. In alcune ricerche, si ipotizza un aumento del rischio di insorgenza della malattia quando l'età dei genitori è superiore ai 35-39 anni per le donne ed ai 40 anni per gli uomini, anche se la sola "età avanzata" del padre non sembra comportare alcun incremento nella percentuale di insorgenza di anomalie (21).

L'incidenza neonatale attualmente osservata e che più interessa per i suoi risvolti sociali ed esistenziali dipende dall'incidenza reale tra tutti gli zigoti concepiti (praticamente ignota), dall'abortività spontanea di embrioni e feti con SD, e dall'abortività selettiva indotta dopo la diagnosi prenatale.

L'incidenza della SD tra i feti al momento della diagnosi prenatale (villocentesi o amniocentesi) risulta più elevata di quella neonatale poiché l'abortività spontanea della SD è abbastanza consistente.

La probabilità che il feto vada incontro ad aborto spontaneo dipende dall'età gestazionale considerata: a 12 settimane (età gestazionale in cui si effettua la villocentesi) è intorno al 50% e a 16-18 settimane (età gestazionale in cui si effettua l'amniocentesi) è intorno al 30-35%. Ciò spiega perché alla diagnosi prenatale si osservino più trisomie che alla nascita e serve a riflettere sul fatto che su 100 Ts21 osservate alla villocentesi e all'amniocentesi, rispettivamente 50 e 35 sarebbero comunque andate incontro ad aborto spontaneo.

## **2.2) GENETICA: REGOLAZIONE GENICA ED ALTERAZIONE CROMOSOMICHE**

Il patrimonio genetico umano è costituito da 23 coppie di cromosomi omologhi, proveniente metà dalla cellula germinale paterna e metà da quella materna.

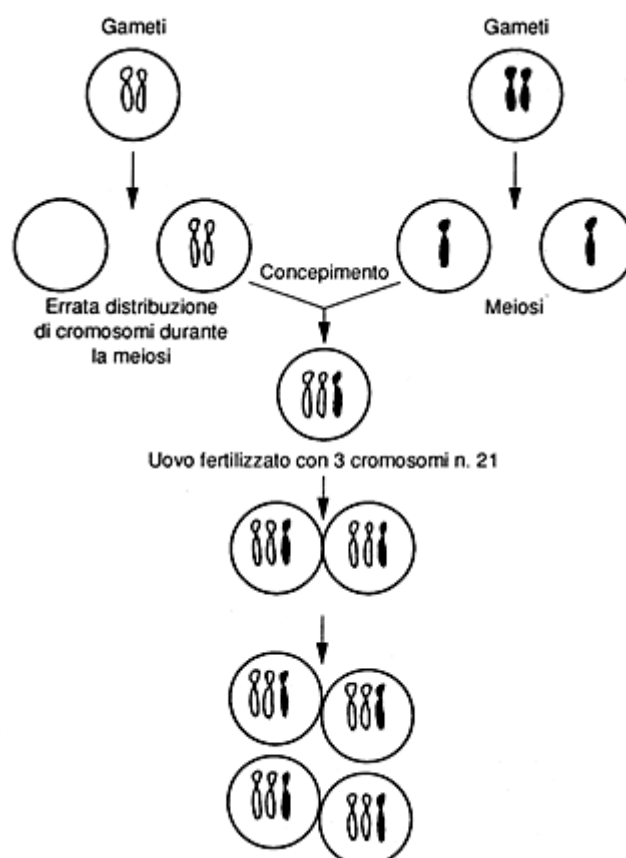
Le cellule di entrambe le linee germinali giungono alla maturazione mediante meiosi dando origine a spermatozoi e ovociti che, a differenza di tutte le altre cellule dell'organismo, hanno un patrimonio genetico dimezzato, aploide ( $n$ ). Durante la prima divisione meiotica, si ha l'accoppiamento dei cromosomi omologhi, lo scambio di materiale genetico fra i due cromosomi e la disgiunzione dei due cromosomi omologhi, che vanno a collocarsi in cellule distinte.

Il processo di maturazione si completa soltanto con una seconda divisione meiotica, che è identica alla mitosi, ma che genera due cellule aploidi, in quanto avviene in presenza di un corredo cromosomico aploide.

I passaggi in cui si possono determinare alterazioni cromosomiche a questo livello sono: l'appaiamento dei cromosomi omologhi, la ricombinazione, la disgiunzione, la segregazione.

Nella Ts21 si ha una non-disgiunzione e un'alterata segregazione, cioè la mancata trasmissione di un intero cromosoma alla cellula in maturazione.

Nella maggior parte dei casi l'errore che determina l'alterazione cromosomica si verifica durante la meiosi. Più raramente gli errori si verificano durante il processo di moltiplicazione cellulare dopo il concepimento (Fig. 3)



**Figura 3: Errata divisione cellulare nella Ts21**  
(<http://www3.unibo.it/avl/org/down/pagine/down/chisono/down.htm>)

Oggi si ritiene che i cromosomi siano in qualche modo predisposti verso determinate alterazioni durante la prima divisione meiotica e che questa fragilità diventi sempre più manifesta nella donna in età avanzata.

L'età, dunque, renderebbe meno efficaci sia i meccanismi che cercano di contrastare la non disgiunzione dei cromatidi mal-ricombinati sia le difese biologiche deputate a distruggere gli spermatozoi, le uova e gli zigoti anomali. Nei soggetti con corredo cromosomico normale, l'errore meiotico rappresenta un evento occasionale e non ereditario, se non in casi eccezionali.

Approssimativamente il 95% dei casi di soggetti affetti da SD presentano tre cromosomi 21, portando alla conta di 47 cromosomi anziché di 46.

Il restante 5% dei soggetti affetti da SD presenta anomalie cromosomiche denominate "mosaicismo" (nel 2% dei casi) e "traslocazione" (nel 3% dei casi). Nei casi in cui la sindrome è determinata da trisomia cromosomica, definita anche trisomia "libera" o "primaria", il cromosoma soprannumerario può originare dallo sviluppo sia dell'uovo che dello spermatozoo, anche se sembra oramai appurato come nel 75% dei casi la trisomia origini nel corso della meiosi materna, mentre nel 25% l'errore avviene nella maturazione meiotica della cellula germinale paterna. Quando l'ovulo e lo spermatozoo si uniscono per dar luogo all'ovulo fecondato, si realizza perciò un corredo con 3 cromosomi 21. (Fig. 4)

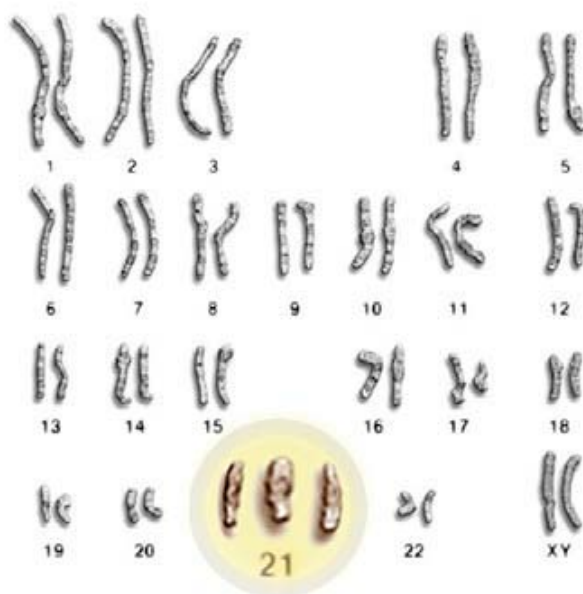


Figura 4: Corredo cromosomico tipico di un paziente affetto da SD



Quando l'embrione si sviluppa, questa situazione si ripete in tutte le cellule. Nel caso del cosiddetto "mosaicismo", la terza copia del cromosoma 21 è presente in molte cellule dell'organismo ma non in tutte.

L'ovulo fecondato presenta inizialmente il corretto numero di cromosomi ed in seguito ad un errore nella divisione cromosomica durante lo sviluppo dell'embrione, alcune cellule acquisiscono un cromosoma 21 in più.

Questa condizione si manifesta quando alcune cellule con trisomia perdono un cromosoma durante la replicazione o quando uno dei cromosomi 21 non subisce la disgiunzione nella fase immediatamente post-zigote.

Di conseguenza, in individui affetti da DS dovuta a casi di trisomia 21 a mosaico si possono avere 46 cromosomi in alcune cellule e 47 cromosomi in altre. In questa situazione, la gamma di manifestazioni cliniche legate alla sindrome può essere variabile, in relazione al numero di cellule che presentano l'anomalia (57).

In circa il 3% dei casi si presenta infine una situazione alquanto particolare denominata "Traslocazione Robertsoniana": nonostante il corredo cromosomico di tutte le cellule dell'organismo dell'individuo presenti 46 cromosomi il soggetto manifesta in tutto e per tutto le caratteristiche della sindrome. Nella traslocazione robertsoniana, in uno dei due genitori un braccio del cromosoma 21 si fonde ad un altro cromosoma acrocentrico (di solito il cromosoma 14). Gli individui portatori di tale traslocazione sono fenotipicamente normali, ma presentano un'elevata probabilità di avere figli con Sindrome di Down (forma familiare). Quest'ultima forma è indipendente dall'età della madre. La presenza di un cromosoma 21 aggiuntivo porta ad una "over-expression" dei geni coinvolti.

Numerosi sono i geni iper-espressi implicati nell'insorgenza della SD:

- *SOD1*, la cui sovraespressione causa invecchiamento precoce e depressione del sistema immunitario: si ipotizza inoltre, nonostante siano necessarie ulteriori indagini di approfondimento, che questo gene sovraespresso sia responsabile del deficit cognitivo e dello sviluppo e, in età adulta, di una forma di Demenza senile tipo Alzheimer.
- *COL6A1*, la cui sovraespressione può causare difetti cardiaci.

- *ETS2*, che se sovraespresso causa anomalie scheletriche.
- *CAFIA*, la cui sovraespressione causa alterata sintesi del DNA.
- *Cystathione Beta Synthase (CBS)*, la cui sovraespressione può causare difetti metabolici ed alterare i processi di riparazione del DNA.
- *DYRK*, la cui sovraespressione causa ritardo mentale. Questo gene, che viene espresso durante la proliferazione dei neuroblasti ed è ritenuto un importante omologo nella regolazione delle cinetiche del ciclo cellulare durante la divisione cellulare, interviene nello sviluppo cerebrale
- *CRYAI*, la cui sovraespressione è associata alla cataratta.
- *GART*, la cui sovraespressione può causare alterata sintesi e riparazione del DNA, codifica infatti per tre diversi enzimi coinvolti nella sintesi delle purine. Interviene nello sviluppo cerebrale ed è espresso durante lo sviluppo prenatale del cervelletto.
- *IFNAR*, è il gene per l'espressione dell'interferone, la cui sovraespressione può interferire con il sistema immunitario così come con altri organi.
- *APP*, sembra essere coinvolto nella plasticità e nell'espressione neuritica; interviene nella patologia tipo Alzheimer.
- *S IOOB*, stimola la proliferazione gliale; interviene nella patologia tipo Alzheimer.

Nessun gene è stato finora direttamente collegato a caratteristiche specifiche della SD. Tuttavia i soggetti affetti risultano essere maggiormente a rischio per quel che riguarda l'insorgenza di cataratta e di difetti del cristallino, a causa dell'espressione anormale di una particolare proteina, alfa-A-cristallina, componente strutturale del cristallino, il cui gene si trova sul cromosoma 21 nella regione q22.

Gli effetti della sovraespressione di geni possono dipendere dalla penetranza dell'allele presente nel soggetto affetto dalla malattia. Se un allele causa una condizione presente in alcuni soggetti ma non in altri, si parla di "penetranza variabile", condizione che pare verificarsi proprio nella trisomia 21 (la presenza di determinati alleli non determina le stesse caratteristiche in tutti i soggetti che li manifestano).

L'impiego di modelli di SD nei topi è uno degli approcci più promettenti che meglio favorisce la comprensione del fenotipo.

I geni identificati sul cromosoma 21 umano sono stati identificati su tre cromosomi separati nel topo.

Uno studio condotto da Reeves e colleghi (64) mostra come la trisomia completa del cromosoma 16 nel topo sia di solito letale; tuttavia sono riusciti a produrre topi con una trisomia parziale del cromosoma 16 che mostrano molte delle caratteristiche osservate nelle persone con SD, come deficit di apprendimento, alterazione dello sviluppo del cranio e della faccia ed alterazioni neuropatologiche associate ad una demenza tipo Alzheimer (65; 36).

### 2.3 DIAGNOSI PRE E POST NATALE DELLA SD

La diagnosi prenatale per le anomalie cromosomiche, introdotta negli anni '70, si limitava all'amniocentesi e/o alla villocentesi eseguita nel secondo trimestre di gravidanza (Fig. 5)



**Figura 5: Villocentesi:** Tecnica invasiva di diagnosi prenatale che ha lo scopo di individuare eventuali anomalie cromosomiche del feto.

Da circa 20 anni a questa parte, lo sviluppo di nuove tecnologie ha contribuito a migliorare notevolmente i metodi di indagine prenatale esistenti, favorendo anche l'introduzione in routine di nuovi approcci che permettessero la diagnosi di anomalie fetali utilizzando metodiche meno invasive e rischiose sia per la madre che per il feto.

Recentemente si sono diffusi su larga scala test diagnostici prenatali, quali il Tritest, Duotest, l'ecografia della plica nucale, che valutano, tenendo conto della predittività legata all'età della madre, il rischio di avere un bambino affetto da Sindrome di Down o da altre anomalie cromosomiche, dosando tre sostanze particolari: alfa-fetoproteina, estriolo non coniugato e frazione beta della gonadotropina corionica (13; 85).

Test di questo tipo, sebbene abbiano il vantaggio di essere molto poco invasivi, quindi privi di rischi, sia per la madre che per il feto, non consentono tuttavia una diagnosi sicura, avendo una predittività dell'80-85% con un rischio di falsi positivi pari al 5% (88).

Questi nuovi esami diagnostici vengono quindi considerati solo preliminari ed in caso di esito positivo si procede comunque con la villocentesi o l'amniocentesi, in quanto soltanto questi test garantiscono la certezza diagnostica mediante la determinazione del cariotipo attraverso l'esame delle cellule embrionali.

L'amniocentesi viene solitamente effettuata intorno alla 16a-18a settimana di gestazione, attraverso il prelievo con una siringa di una piccola quantità del liquido amniotico, che avvolge il feto all'interno dell'utero, e la villocentesi tra la 12a e la 13a settimana, che viene svolto meno comunemente e che consiste in un prelievo di cellule da cui si svilupperà la placenta, i villi coriali appunto.

Il rischio di aborto causato dall'esecuzione di un test diagnostico prenatale si attesta intorno all'1% per l'amniocentesi e al 3% per il prelievo dei villi coriali.

Ad oggi si cerca di consigliare l'amniocentesi alle donne considerate a rischio (con più di 35 anni o madri di un figlio con SD) e di proporre il Tritest alle donne in gravidanza con meno di 35 anni che solo successivamente, in caso di test positivo, saranno sottoposte ad esami di conferma più invasivi.

Nel caso si sia fatto ricorso alla fecondazione assistita, per la diagnosi prenatale si utilizza la diagnostica pre-impianto (DPI), che consiste in un test genetico condotto sull'embrione mediante prelievo di una o due cellule (blastomeri). Il DPI, effettuato a partire dal terzo giorno dopo la fecondazione quando l'embrione è composto da 8 cellule, permette di verificare la presenza di malattie ereditarie. L'elevato utilizzo delle tecniche di diagnosi prenatale precoce ha portato ad un progressivo aumento di aborti selettivi.

Attualmente la frequenza delle interruzioni di gravidanza legate alla diagnosi prenatale di Ts21 si aggira attorno al 70% dei concepiti. Queste tecniche suscitano ancora oggi numerose obiezioni di carattere etico e legale.

Sebbene alla nascita i bambini affetti da SD mostrino caratteristiche specifiche che rendono la sindrome facilmente distinguibile, la diagnosi di malattia può essere confermata anche in epoca post natale. Come succede normalmente per tutti i neonati, è opportuno che i genitori scelgano un pediatra dal quale fare seguire il bambino. Il pediatra rappresenta il punto di riferimento per i genitori, in quanto, oltre a farsi carico degli aspetti generali relativi alla salute del bambino, coordinerà anche le visite specialistiche che andranno effettuate in determinati momenti, per permettere un intervento tempestivo in grado spesso di prevenire possibili complicanze. I medici dispongono ormai di indicazioni sufficientemente precise a proposito dei principali controlli cui devono essere sottoposti i bambini Down nelle diverse epoche della vita. L'importanza di effettuare l'analisi del cariotipo nasce proprio in questo momento, in quanto permette di capire di che tipo di Ts21 si tratta e perché permettere di effettuare una corretta consulenza genetica familiare in grado di precisare qual è la probabilità di avere un altro figlio con SD. I pazienti affetti da SD alla nascita sono solitamente soggetti ad uno screening neonatale che comprende una serie di esami volti a fornire informazioni sul funzionamento, per esempio, della tiroide, che spesso, nei bambini Down funziona meno bene rispetto alla norma, sulla situazione ematologia, mediante un prelievo del sangue e l'esame del numero e delle caratteristiche delle sue cellule: nel bambino Down può essere, a volte, presente un aumento soprattutto dei globuli rossi che i medici definiscono poliglobulia.

Durante le visite il pediatra effettua la valutazione dello sviluppo psicomotorio e dell'accrescimento del bambino; prescrive gli esami di laboratorio periodici, utili per evidenziare eventuali anemie, anomalie cardiache, infezioni delle prime vie aeree, della mucosa oculare e alterazioni a livello dell'udito.

Una diminuzione dell'udito, infatti, non diagnosticata precocemente e non trattata può influire sullo sviluppo del linguaggio del bambino. Dopo il primo anno, vanno effettuati anche controlli odontoiatrici, data la frequenza di disturbi cui questi pazienti sono predisposti, per poter effettuare le terapie indicate. Un aspetto molto importante è quello relativo alle vaccinazioni nei riguardi delle quali esistono ancora molti pregiudizi che non hanno alcun fondamento scientifico. E' essenziale invece che il bambino sia sottoposto alle vaccinazioni obbligatorie nei tempi prescritti dalla legge compresa quella per l'epatite B, ed è consigliabile che effettui anche quelle con obbligatorie come, ad esempio, la vaccinazione anti-morbillosa. Ciò soprattutto considerando la presenza di deficit immunitari che spesso si associano alla sindrome di Down condizionando una maggiore suscettibilità a malattie infettive di diverso tipo.

## 2.4 MANIFESTAZIONI CLINICHE DELLA SD

La valenza clinica della SD è stata riconosciuta circa 150 anni fa, ma soltanto di recente si è cercato di studiare meglio la patogenesi di questa sindrome, al fine di gestire poi queste informazioni in modo tale da provare a migliorare la gestione ed il trattamento del paziente al momento della diagnosi (3).

Il quadro della malattia solitamente è evidente sin dalla nascita: il bambino Down presenta, infatti, tratti fisionomici caratteristici che verranno mantenuti anche nell'età adulta, e sebbene la sindrome si manifesti con caratteristiche differenti, ogni bambino non ne mostri più di sei o sette, fattore peculiare questo che rende la sindrome estremamente eterogenea nelle sue manifestazioni.

Il bambino affetto da SD mostra un grado più o meno elevato di deficit intellettivo, è piccolo di statura con una ipotonia ed una lassità articolare abbastanza marcate, che favoriscono la protrusione linguale.

Il cranio è brachicefalo, il diametro antero-posteriore del capo è più corto e con occipite piatto; le orecchie sono piccole, spesso dismorfiche e a basso impianto.

Il viso mostra un caratteristico aspetto "orientaleggiante", arrotondato, piuttosto schiacciato, con naso piccolo e radice piatta. Gli occhi sono piccoli e distanziati con caratteristico taglio obliquo delle rime palpebrali, dal basso in alto e dall'interno all'esterno. Il collo è tozzo e corto, il torace piatto e allungato, l'addome espanso e il bacino basso e largo. (Fig.6/A).

Le mani sono caratteristicamente tozze per la brevità delle ossa metacarpali delle falangi e le pliche cutanee del palmo presentano un andamento particolare caratterizzato dal solco palmare unico. (Fig.6/B)





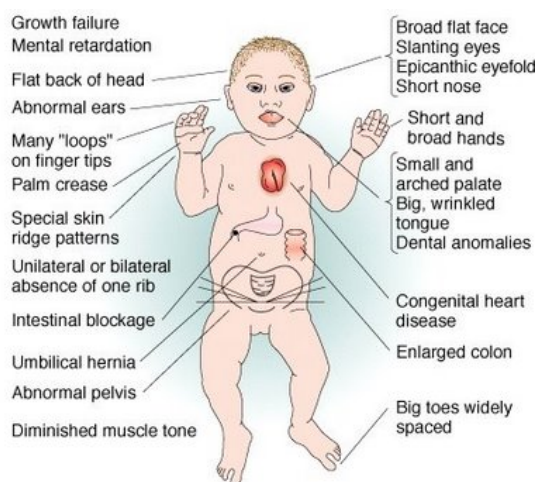
**Figura 6/A-B: Bambino affetto da SD:** La foto mostra tutte le caratteristiche fenotipiche di un soggetto affetto: upslanting delle rime palpebrali, pelle flaccida sulla nuca del collo, palato stretto, brachicefalia, ponte nasale piatto, brevi mani larghe, collo corto, denti anormali, bocca aperta con gli angoli rivolti verso il basso e la lingua sporgente, trasversali pieghe palmari, e le orecchie piegate o displastiche (81).

Come anticipato nel paragrafo precedente, questi tratti fisionomici possono essere presenti, in modo più o meno evidente, anche in neonati non trisomici, per cui la diagnosi certa di SD si ottiene solo con un'analisi citogenetica che prevede lo studio del cariotipo eseguendo una mappatura cromosomica.

## 2.4.1 ANOMALI SISTEMICHE

### APPARATO CARDIO-CIRCOLATORIO

La maggior parte dei disturbi che creano i problemi peggiori nel corso della vita nel 40% delle persone affette da SD comprendono malformazioni viscerali a carico di numerosi organi, tra cui il cuore. (67;84). (Fig. 7)



**Figura 7: Malformazioni frequenti associate alla SD**

Le alterazioni più frequenti a livello cardiaco sono rappresentate da: shunt sinistro o destro, canale atrioventricolare comune, persistenza dell'ostium primum, pervietà del setto interventricolare, patologie della valvola mitrale e tricuspide, (7; 23; 24), comunicazione interventricolare, persistenza del dotto di Botallo, comunicazione interatriale isolata, tetralogia di Fallot (84).

Gran parte di queste patologie cardiache vengono corrette chirurgicamente già nella prima infanzia, con una prognosi molto favorevole.

Alcuni autori riportano una scarsa arborizzazione vascolare nei soggetti affetti da SD e la possibile presenza di malformazioni di tipo angiomaso, soprattutto a carico del fegato e dei reni. Tale aspetto della rete arteriosa può essere presente anche a livello dell'encefalo e si ipotizza sia responsabile di processi ateromasici oltre il venticinquesimo anno di età. (17).

#### SISTEMA IMMUNITARIO

Oltre agli effetti sulla morfogenesi e sulla funzionalità del SNC, la trisomia 21 produce anche molti cambiamenti nella funzionalità cellulare a livello del sistema immunitario ematopoietico.

Anche se l'incidenza di infezione è stata notevolmente ridotta con la disponibilità di vaccinazioni per i diversi agenti patogeni virali e batterici, gli antibiotici ed una igiene migliore, il quadro immunitario nei soggetti con SD risulta comunque alterato dal punto di vista sia qualitativo che quantitativo, e questo espone il paziente ad un maggior rischio infettivo a qualsiasi età (33; 82). Maturazione anormale della funzione timo e compromissione dei linfociti T sono stati implicati in questa suscettibilità alle infezioni (53; 60). Questo dato non è riconosciuto in maniera unanime; altri autori, infatti, evidenziano come, sebbene molte cellule immunitarie siano immature, la conta linfocitaria B sia normale o solo lievemente ridotta. Nei soggetti Down i polimorfonucleati (PMN), sebbene la loro conta sia nella norma, presentano un alterato turn-over che determina la presenza in circolo di un elevato numero di cellule immature. I PMN circolanti e i monociti mostrano difetti di tipo funzionale, con chemiotassi ridotta e capacità fagocitaria normale (56).

I linfociti mostrano una scarsa risposta immunitaria agli antigeni, sebbene il rapporto tissutale (Th/Ts) risulti molto elevato. L'infiltrato infiammatorio tissutale appare ricco di linfociti B, probabilmente come conseguenza dell'aumentato rapporto Th/Ts. Inoltre il livello di immunoglobuline sieriche si presenta diminuito.

Più sorprendente, sebbene quantitativamente molto meno importante, è la propensione di bambini con SD di sviluppare leucemia acuta, più comunemente megacarioblastica acuta (M7) leucemia, con una frequenza venti volte superiore a quella nella popolazione normale (34).

Questa è spesso preceduta da una reazione neonatale leucemoide (transitoria malattie mieloproliferative), che potrebbe essere una forma di leucemia transitoria.

La leucemia colpisce all'incirca 1 bambino Down ogni 200, dato superiore di 10-15 volte rispetto alla frequenza con cui si presenta la malattia nella popolazione normale (32). Il rischio di sviluppo di tumori solidi maligni è invece più basso rispetto alla restante popolazione (89); tuttavia in questi casi i bambini con SD sembrano avere una prognosi migliore e richiedono meno la chemioterapia rispetto ai bambini senza DS (25).

### SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Il SNC subisce gli effetti dello stato trisomico per tutta la vita. Ad eccezione di un certo grado di ipoplasia del cervelletto (5), il cervello dei soggetti affetti da SD risulta grossolanamente normale. Tranne un'ipotonia centrale, che è forse il segno più frequente della SD, lo sviluppo dell'individuo è caratterizzato da ritardo nello sviluppo cognitivo nella prima infanzia, che si traduce, nella fanciullezza, in un lieve o moderato ritardo mentale, seguito dalla perdita delle abilità cognitive in età adulta e dallo sviluppo della malattia di Alzheimer (AD) negli anni successivi. Infatti, la deposizione della proteina amiloide è stata osservata per la prima volta nella seconda decade di vita nei soggetti affetti (69) tanto che la patologia completa del AD sembra essere sempre presente a partire dai 35 anni di età in poi - una cinquantina di anni prima rispetto alla popolazione normale.

Sebbene molti aspetti della patologia siano ancora da chiarire, alcuni geni coinvolti sono già stati identificati e tutti appartengono al tratto corrispondente alla regione 22 del braccio lungo del cromosoma 21.

I geni *GART*, *SOD-1*, *COS* e *APP* codificano per specifiche proteine ad attività enzimatica, coinvolte rispettivamente nella biosintesi delle purine, nella produzione di perossido di idrogeno, nel metabolismo di metionina e cisteina e nella sintesi del precursore del peptide  $\beta$ -amiloide.

Una mutazione a carico di uno di questi geni è in grado di determinare la malattia. Essendo *APP* localizzato sul cromosoma 21, si ritiene che la trisomia nei soggetti Down determini un'iperattività del gene e conseguente formazione delle tipiche placche senili (3).

Il gene che codifica il precursore del peptide  $\beta$ -amiloide (*APP gene*) è quello che maggiormente collega la demenza nei soggetti affetti da Ts21 con la malattia di Alzheimer. Tra le due patologie vi sono similitudini di ordine neurochimico (diminuzione di colina acetiltransferasi, acetilcolinesterasi, norepinefrina, dopamina, serotonina), metabolico (riduzione del metabolismo glucidico cerebrale) e neuropsicologico (demenza).

Nel soggetto Down sin dall'età di 10 anni si ha la formazione nel SNC di aggregati di  $\beta$ -amiloide e molti oltre i 35 anni sviluppano un quadro istopatologico tipico della Demenza di Alzheimer. Il *gene APP* è coinvolto nel trasporto del mioinositolo, una proteina ad azione amiloidogena (che condiziona il deposito della  $\beta$ -amiloide) che caratterizza il cervello dei soggetti affetti da malattia di Alzheimer.

Nei soggetti sani la  $\beta$ -amiloide deriva dalla APP (proteina progenitrice dell'amiloide) in una reazione biologica catalizzata dall'alfa-secretasi che produce una beta-amiloide costituita da 40 amminoacidi. Per motivi non totalmente chiariti, nei soggetti malati l'enzima che interviene sull'APP non è l' $\alpha$ -secretasi ma una sua variante, la  $\beta$ -secretasi, che porta alla produzione di una  $\beta$ -amiloide anomala, costituita da 42 amminoacidi invece che 40, che non presenta le caratteristiche biologiche della forma naturale, ma tende a depositarsi in aggregati extracellulari sulla membrana dei neuroni. Le placche neuronali innescano un processo infiammatorio che richiama macrofagi e neutrofili, con produzione di citochine, interleuchine e  $TNF\alpha$ , responsabili di un danno irreversibile ai neuroni (73).

Ulteriori studi mettono in evidenza che nei malati di Alzheimer interviene un ulteriore meccanismo patologico: all'interno dei neuroni, una proteina tau, fosforilata in maniera anomala, si accumula in aggregati neurofibrillari o ammassi neurofibrillari. Particolarmente colpiti da questo processo patologico sono i neuroni colinergici, specialmente quelli delle aree corticali, sottocorticali e, tra queste ultime, le aree ippocampali.

I segni clinici ed i sintomi della malattia sono rappresentati il più delle volte da crisi comiziali (58%), cambiamenti nella personalità (46%), apatia (36%) e perdita delle abilità conversazionali (36%) (51; 54; 83).

### APPARATO MUSCOLOSCHELETRICO

Tra i vari disturbi correlati alla SD, quelli di natura ortopedica sono sicuramente tra quelli che si verificano più frequentemente, e la maggior parte sono relative alla ipotonia muscolare, ipermobilità articolare, e lassità legamentosa.

L'ipotonia consiste in una riduzione del tono muscolare, ossia di quella leggera resistenza che un muscolo normale rilassato offre al movimento passivo. Questa sembra derivare da una disfunzione cerebellare e tende a ridursi o a scomparire con l'aumento dell'età (5). Questo miglioramento è favorito dalle tecniche di riabilitazione messe in atto già nella prima infanzia, anche se studi ipotizzano che questo fenomeno rientri in un processo evolutivo naturale.

La lassità legamentosa presente con entità variabile, porta ad apertura esagerata in abduzione delle anche (180°) e diminuzione dell'angolo del polso, con aumentato rischio di lussazione. Non è stata ancora trovata una spiegazione ma l'ipotesi più accreditata è che esista uno squilibrio tra la crescita del tessuto articolare, che avverrebbe normalmente, e la crescita delle ossa articolatorie, che tenderebbe ad essere inibita. Occorre innanzitutto ricordare che la crescita dell'osso avviene tramite l'attività delle cartilagini ossee di accrescimento, e che queste sono sensibili alla quantità di omocistina disponibile.

Se l'omocistina è in eccesso, gli individui saranno alti, magri, con un maggior numero di pieghe nelle superfici flessorie. Nei soggetti Down, in cui l'aumento del 50% dell'attività del medesimo enzima metabolizza più attivamente l'omocisteina, la disponibilità è ridotta, e ne consegue che gli individui sono bassi, con riduzione del numero delle pliche flessorie. Questo squilibrio tra tessuti articolatori e dimensioni delle ossa articolari, sarebbe responsabile della lassità articolare.

I problemi muscoloscheletrici che comunemente si verificano in pazienti con sindrome di Down includono proprio l'instabilità del rachide cervicale, scoliosi, disturbi d'anca e di instabilità rotulea.

Una delle principali preoccupazioni nella sindrome di Down è l'instabilità del rachide cervicale superiore. L'incidenza di instabilità è riportato essere 10-15% (61; 62). Il ritardato riconoscimento di questa condizione può provocare irreversibili danni del midollo spinale. L'instabilità può verificarsi a livello dell'articolazione atlanto-assiale o occipito-cervicale comune (87).

A livello atlanto-assiale, questa lassità può essere associata alla presenza di una quantità di collagene anormale a livello del legamento trasverso, che, a sua volta, può causare un movimento anomalo tra i segmenti che portano alla instabilità.

Proiezioni radiografiche standardizzate del rachide cervicale, tra cui l'antero-posteriore, a bocca aperta, sono strumenti utili per identificare questa instabilità, che viene diagnosticata sulla base di un aumento dell'intervallo atlanto-dentale, (ADI), del rachide cervicale.

Nei bambini più grandi (oltre 8 anni) e negli adulti l'ADI dovrebbe essere di 3mm circa, mentre nei bambini più piccoli deve raggiungere i 4mm. (alcuni considerano 5 millimetri accettabile) (45).

Questa misure, tuttavia, non sempre sono correlate al grado di compressione.

L'instabilità a livello della giunzione occipito-cervicale, è invece causata dalla lassità del complesso di tessuti molli che si trovano a sostegno dell'atlante (61) che nel peggiore dei casi può progredire in eventuali eventi traumatici, inducendo iperestensione o flessione del collo, fino alla catastrofica compressione del midollo spinale.

L'instabilità occipito-cervicale risulta però più difficile da identificare con tecniche radiografiche a causa della sovrapposizione delle strutture ossee alla base del cranio.

Anche la scoliosi può verificarsi in associazione con la sindrome di Down. La maggior parte dei casi di scoliosi in questi pazienti si presume essere di natura toracogenica, dal momento che insorge secondariamente ad una toracotomia pre-chirurgia cardiaca (52; 6). Gli attuali sviluppi nella diagnosi di disturbi cardiaci nella popolazione sindrome di Down porta indirettamente ad aumentare ulteriormente l'incidenza di scoliosi toracogenica. Sulla base di questa constatazione, bambini con sindrome di Down in età scolare, in particolare quelli che sono stati soggetti a cardiocirurgia, dovrebbero essere sottoposti ad esami fisici di routine per la scoliosi.

Un'altra alterazione muscolo-scheletrica caratteristica della sindrome è la lussazione o displasia dell'anca. L'incidenza complessiva di tale alterazione varia da 1,25% al 7% nei pazienti istituzionalizzati (16; 9; 78). Questi numeri possono essere inferiori nei pazienti in comunità. La lussazione o sublussazione può o non può essere associata con displasia acetabolare; l'instabilità dell'anca sembra essere molto probabilmente legato alla lassità capsulare e basso tono muscolare. I sintomi si verificano raramente alla nascita, ma tipicamente sono identificati tra i 2 e 10 anni. I pazienti possono presentare con lussazione abituale primi anni di vita o con lussazione acuta in seguito durante l'infanzia (> 7 anni).

Molto comune in questi pazienti è anche la presenza, soprattutto nel periodo dell'infanzia, del piede piatto-valgo e la marcata pronazione del piede, che

causano deambulazione instabile con classica andatura alla "Chaplin" caratterizzata da rotazione esterna delle anche, ginocchia valghe in flessione e tibie ruotate esternamente (67).

#### PATOLOGIE DERMATOLOGICHE

La SD è associata con numerose dermatiti piuttosto comuni ma anche con patologie dermatologiche rare.

I soggetti con Trisomia 21 possono presentare dermatite atopica con quadri clinici anche severi e di difficile risoluzione. La dermatite atopica si manifesta con aree di pelle arrossata, squamosa e pruriginosa, localizzate più frequentemente sulle guance, dietro alle orecchie e a livello delle articolazioni. Spesso tali lesioni vanno incontro a processi di "lichenificazione" o "impetiginazione" a causa anche dell'aumentata suscettibilità alle infezioni (71).

Altri disordini dermatologici cronici che si presentano con elevata frequenza nelle persone con Ts21 sono:

- ipercheratosi (aree di pelle ispessita presenti soprattutto sul palmo delle mani e sulle soles dei piedi)
- siringomi (tumori benigni che derivano dalle ghiandole sudoripare)
- vitiligine (perdita di pigmentazione della pelle in aree ben definite, determinata probabilmente dalla produzione di autoanticorpi contro i melanociti)
- Acantosi Nigrans (aumento della pigmentazione di alcune aree della cute che appaiono anche rilevate e squamose, frequentemente localizzate su collo, mani, inguine; spesso in associazione con diabete di tipo II)
- Elastosi Perforans Serpinginosa (malattia del tessuto elastico che provoca lesioni rosse profonde in particolare a livello della cute del collo, del mento, delle labbra, delle guance, delle ginocchia; quattro volte più frequente nei maschi rispetto alle femmine)



- follicolite (processo infiammatorio e/o infettivo dei follicoli piliferi causato, nella maggior parte dei casi, da stafilococchi; nella sindrome di Down ne è stata descritta anche una forma ad eziologia "fungina") (47).

Una ulteriore manifestazione cutanea molto frequente nei soggetti affetti da SD è l'alopecia, patologia caratterizzata dalla perdita irregolare dei capelli, presumibilmente dovuta ad una alterata risposta immunitaria nei confronti dei follicoli piliferi. Questa "patologia" si presenta nei pazienti con Ts21 con una frequenza che va dal 5% al 9%, contro una percentuale che nella popolazione normale si assesta tra l'1% e il 2%. La perdita di capelli può essere definitiva o transitoria e può presentarsi contemporaneamente su più aree del cuoio capelluto (11).

#### PATOLOGIE GASTROINTESTINALI

Nei neonati trisomici sono state descritte numerose anomalie gastroenterologiche, in particolare atresia tracheo-esofagea, atresia duodenale, ano imperforato. La maggior parte di queste anomalie richiede un immediato intervento chirurgico per la correzione del danno anatomico. Particolare attenzione deve essere posta all'emissione di meconio (entro le prime 24 ore dalla nascita) e ai segni di occlusione intestinale.

I soggetti affetti da trisomia 21 presentano un rischio aumentato dal 7% al 16% rispetto alla popolazione normale di sviluppare celiachia.

La Malattia Celiaca (Mc) è una intolleranza al glutine geneticamente determinata; il glutine (in particolare la gliadina che ne rappresenta la frazione s23) è una proteina ad alto peso molecolare presente nel cariosside di frumento, avena, orzo, segale e triticale ma non nel mais, nel riso e nella soia. La sua digestione avviene nell'intestino tenue ad opera di una specifica peptidasi. La malattia consiste in una mancata frammentazione del glutine per mancanza della peptidasi, per cui la proteina "intera" agisce sulla mucosa intestinale con effetto "tossico", producendo nel tempo un danno sempre più evidente e con manifestazioni cliniche sempre più gravi.

L'età di insorgenza è legata all'epoca di introduzione del glutine nell'alimentazione.

L'effetto tossico si esprime con lo sfaldamento della superficie di assorbimento intestinale cui consegue, come compensazione, l'ipertrofia delle cripte e una accelerata proliferazione e migrazione cellulare a sostituire quelle danneggiate.

La Mc si può manifestare sia con sintomi gastrointestinali che con sintomi atipici come anemia, deficit di densità ossea e di accrescimento (26).

Si riscontrano frequentemente forte irritabilità, calo dell' appetito, diarrea e vomito.

La sintomatologia clinica della malattia nei soggetti con DS è spesso sfumata o confondente (atipica o del tutto silente in oltre il 30% dei casi), proprio per questo, a partire da primo anno di vita (e nel caso di negatività anche negli anni successivi), è fondamentale effettuare accertamenti di laboratorio specifici. In questa categoria di pazienti a rischio è giustificato lo screening sierologico da effettuarsi con la determinazione degli anticorpi anti-endomisio (EMA) ed anti-transglutamasi (t-TG) umana, data la bassa specificità degli anticorpi anti-gliadina (AGA) in questa sindrome. E' utile anche ricercare gli aplotipi HLA che più frequentemente correlano con la Mc (DQ2,DQ8,DR3,DR7), soprattutto in quei pazienti per i quali la conferma diagnostica con la biopsia intestinale può comportare difficoltà. La valutazione dello stato della mucosa intestinale (sana o danneggiata) quale reperto istologico ottenuto da biopsia intestinale in corso di indagine endoscopica, fornisce la diagnosi di certezza (86).

La celiachia è una patologia cronica che può alterare fortemente la qualità della vita; tale malattia può inoltre giocare un ruolo significativo nell'innescare altre patologie autoimmuni o, più raramente, neoplastiche (es. linfomi intestinali). L'unico trattamento valido, che consenta di tenere efficacemente sotto controllo i sintomi, è una dieta priva di cibi contenenti glutine. Un'altra problematica riguardo all'alimentazione molto importante nella sindrome di Down è quella del controllo dell' aumento di peso corporeo. I soggetti affetti da DS, infatti, hanno un' attività metabolica ridotta rispetto ad un soggetto normale e questa condizione li predispone più frequentemente all'obesità (67).

Inoltre è fondamentale monitorare le quantità di calcio e vitamina D introdotte con la dieta, dal momento che, questi pazienti, presentano un grado di densità ossea ridotto.

### PATOLOGIE TIROIDEE

Anomalie della funzionalità della ghiandola tiroidea si riscontrano con una frequenza elevata nei soggetti affetti dalla sindrome di Down (22).

Disturbi della tiroide sono stati riportati fino al 28-40% dei bambini con DS, e aumentano in frequenza, fino al 54%, come l'età dei bambini.

L'ipotiroidismo è una condizione patologica caratterizzata da una carenza degli ormoni tiroidei di cui si distinguono due forme, una congenita ed una acquisita. Nella popolazione generale, l'incidenza dell'ipotiroidismo congenito è di circa 1:3800 nati mentre nei neonati con SD è superiore di circa 28 volte (1:140). La causa di una così alta incidenza dell'ipotiroidismo nel soggetto con SD rimane poco chiara; l'ipotesi più accreditata è quella di una non corretta formazione della tiroide in epoca fetale.

La valutazione di un eventuale ipotiroidismo congenito è estremamente importante poiché questa condizione, che si presenta con frequenza elevata nei neonati Down., aggrava significativamente il ritardo mentale. Attualmente la valutazione dell'ipotiroidismo congenito è inserita tra gli screening neonatali ed è effettuata su tutti i neonati, con una attenzione particolare ai soggetti con SD (86).

Per quanto riguarda l'ipotiroidismo acquisito interessa il 15% - 30% dei soggetti con SD e la sua incidenza aumenta con l'avanzare dell'età (39).

Le cause più frequenti di ipotiroidismo acquisito sono su base autoimmune: l'organismo inizia a produrre anticorpi contro la tiroide (77).

In alcuni casi, nonostante la presenza di autoanticorpi, la tiroide riesce a produrre un quantitativo sufficiente di tiroxina (T4) e la terapia non è necessaria e sono necessari solo controlli frequenti. In altri, invece, si rende necessaria la terapia sostitutiva, è molto semplice e molto efficace.

Molto spesso il rilevamento (con un semplice prelievo di sangue) di anticorpi anti-tiroide (anti-tireoglobulina, anti-perossidasi, anti-microsomi) precede anche di anni le manifestazioni cliniche della tiroidite autoimmune.

Le manifestazioni cliniche sono:

- ritardo di accrescimento
- riduzione del tono muscolare
- stipsi
- cute secca

che possono esser facilmente sottovalutate in quanto confuse con caratteristiche della sindrome

Anche in età adulta l'insorgenza di ipotiroidismo, associata spesso ad un rallentamento o ad una regressione intellettiva potrebbe essere erroneamente confusa con un disturbo di tipo neuropsichico.

Controlli periodici della funzionalità tiroidea sono quindi consigliabili in tutte le fasce di età, anche a considerazione del fatto che un'alterata funzionalità della tiroide può non solo interferire negativamente sulle capacità di apprendimento ma anche causare successivamente una perdita o una regressione delle capacità acquisite.

Almeno il 30% delle persone Down produce autoanticorpi contro la tiroide; anche se è più comune che tale disordine inizi dopo gli 8 anni, sono stati segnalati due casi di presenza di autoanticorpi in lattanti di 6 e 8 mesi. In un 20% dei soggetti con SD è presente una condizione definita "ipertireotropinemia idiopatica isolata" cioè priva di manifestazioni cliniche evidenti, legata a elevati livelli ematici di TSH, probabilmente causata da una disregolazione del TSH stesso, che necessita di uno stretto follow-up. Questa condizione è definita da molti autori come "Ipotiroidismo subclinico o preclinico": è caratterizzata dal punto di vista biochimico dalla presenza di valori sierici elevati di TSH con livelli normali di ormoni tiroidei T3 e T4. L'ipertiroidismo, la condizione opposta alla precedente, caratterizzata da un eccesso di ormoni tiroidei nel circolo ematico, si verifica meno frequentemente nella sindrome di Down (46).

### 2.4.2 ANOMALIE CRANIO-FACCIALI

La Sindrome di Down è caratterizzata da manifestazioni fenotipiche che la rendono peculiare e riconoscibile. Esistono alcune caratteristiche fenotipiche, relative all'aspetto fisico, molto comuni in tutte le persone Down. Tra i tratti somatici peculiari più immediatamente riconoscibili delle persone Down, che costituiscono la base della diagnosi al momento della nascita troviamo i segni di una *facies* caratteristica: il soggetto affetto presenta un cranio microcefalico con nuca appiattita e ricoperta, a livello occipitale, da cute e sottocute lassa e fontanelle larghe che si chiudono in ritardo rispetto alla norma. Per l'assenza di diploe nelle ossa della volta, il cranio si presenta inoltre molto sottile e radiotrasparente. Il forame magno è generalmente piccolo e trasversalmente ellissoidale. Il soggetto mostra un viso tondeggiante e profilo appiattito, il naso è "corto", con radice appiattita e cavità nasali strette al punto che è sufficiente una leggera secrezione per ostruirne il lume, le orecchie sono piccole, tonde, con piega dell'elice e lobo piccolo ed aderente. A livello oculare caratteristico è l'andamento obliquo, dall'alto in basso e dall'esterno all'interno, delle rime palpebrali e la presenza di una plica cutanea a livello dell'angolo interno dell'occhio. L'iride presenta delle caratteristiche macchie biancastre disposte a formare una corona radiale. La differenziazione dei tessuti facciali in questi soggetti avviene precocemente nel periodo embrionale (5°-7° settimana) (76) e l'intero processo della crescita ossea è la risultante di due meccanismi differenti: apposizione e riassorbimento. Ogni struttura ossea, sia essa interna o esterna, è ricoperta da strutture molli o cartilaginee con attività osteogenica, che prendono anche il nome di "centri di crescita". Queste strutture posseggono una forza intrinseca che gioca un ruolo chiave nella crescita di alcune strutture ossee. Nel soggetto con Sindrome di Down, il deficitario e ritardato sviluppo scheletrico (riscontrabile sin dal secondo trimestre di gestazione) e l'ipotonia muscolare generalizzata, si ripercuotono anche a livello del distretto maxillo-facciale, manifestandosi con alterazioni delle dimensioni e della crescita dei mascellari e del tono della muscolatura oro-facciale (42).

Le limitazioni di crescita più evidenti sono a carico dell'area endocranica, e del terzo medio. L'osso etmoide risulta retruso, formando una profonda depressione fra le due orbite mentre l'osso frontale e la base cranica sono ridotte di dimensioni. I seni sfenoidali presentano pneumatizzazione ridotta nel 66% dei casi. Il ritardo di crescita implica inoltre una riduzione della dimensione globale del cranio, con una tendenza di sviluppo in senso brachicefalico (30).

### CRESCITA E SVILUPPO DELLA BASE CRANICA

La base cranica ed il terzo medio del viso risultano iposviluppati già alla nascita. Il terzo inferiore della faccia, caratterizzato da una mandibola prominente, si presenta di dimensioni normali o talora aumentate mentre il mascellare presenta un deficit di sviluppo per una mancata spinta di crescita verso l'avanti e il basso che provoca il persistere delle caratteristiche fetali della faccia.

Le strutture centrali del cranio mostrano una ipoplasia in senso verticale, che determina un abbassamento rispetto alla norma della posizione della sella turcica ed un conseguente appiattimento della base cranica. (4).

Secondo Roche et al. (1961) alla nascita i valori relativi alla lunghezza ed al perimetro del cranio sono paragonabili a quelli di soggetti normali della stessa età ma nei successivi quattro anni di vita, a causa del marcato ritardo di crescita riscontrato nei soggetti sindromici, si costituisce un divario (66).

Nei soggetti Down anche la base cranica posteriore appare sostanzialmente diminuita di dimensioni rispetto alla norma, questo è legato ad una graduale riduzione del tasso di crescita che nei soggetti sindromici avviene già dopo i 15 anni, a dispetto di quanto accade per il gruppo controllo in cui la crescita si protrae almeno fino ai 18-20 anni (1).

### CARATTERISTICHE PALATALI

Lo sviluppo del terzo medio del viso è meno completo rispetto a quello mandibolare. Questo sviluppo incompleto esita in una riduzione della lunghezza, dell'altezza e dell'ampiezza del palato che è già riscontrabile alla nascita e tende ad accentuarsi con la crescita, come confermato da uno studio di Laurisden ed altri su materiale post mortem di feti con SD (43).

Nei pazienti affetti da Trisomia 21 è di frequente riscontro la presenza di un toro palatino che conferisce al palato una caratteristica forma a "W".

La presenza di un palato iposviluppato, di un setto nasale deviato e di una mucosa ispessita contribuiscono ad un restringimento considerevole dell'antro nasale, limitando lo sviluppo delle vie respiratorie superiori. A causa dell'ostruzione di tali vie, i bambini con SD sono costretti a respirare attraverso la bocca ed a mantenere una postura linguale bassa e protrusa, attivando una "matrice funzionale" che ostacola i fisiologici processi di crescita cranio-facciale.

In questi pazienti l'espansione rapida del palato è consigliata al fine di produrre un aumento del volume nasale e favorire la respirazione nasale anziché orale. (15).

### CARATTERISTICHE LINGUALI

Negli anni numerosi studi hanno preso in esame la problematica della reale o pseudomacroglossia nei pazienti con SD (12). Si può parlare di macroglossia "vera" o "assoluta" quando il volume della lingua si presenta decisamente aumentato rispetto alla norma, è possibile invece parlare di macroglossia "relativa" o di pseudo macroglossia quando la lingua, seppur di dimensioni normali, è comunque troppo voluminosa per potersi alloggiare entro confini di un'area cranica iposviluppata.

In uno studio condotto da Guimaraes e Donnelly nel 2008, che confrontava le dimensioni volumetriche della lingua in rapporto ai parametri cranio-facciali in 16 soggetti affetti da SD e altrettanti soggetti con anamnesi medica negativa, si è evidenziato come, nonostante le dimensioni linguali dei bambini affetti da SD in rapporto ai parametri cranio-facciali risultino aumentate, la lingua dei soggetti sindromici è in realtà di dimensioni ridotte rispetto alla norma.

Questo può essere facilmente spiegato dalla concomitante presenza nei soggetti affetti da Trisomia 21 di parametri ossei cranio-facciali che presentano valori più bassi rispetto a quelli normali (31).

Ancora oggi alcuni autori propongono, in casi selezionati, specifici interventi di chirurgia plastica riduttiva (27).

In letteratura è comunque opinione prevalente che la chirurgia sia solo eccezionalmente proponibile e giustificata, poiché le difficoltà masticatorie e fonatorie, più che alle accentuate dimensioni della lingua, sono legate all'ipotonia della muscolatura intrinseca ed estrinseca ed alla flaccidità della muscolatura delle labbra e delle guance che ne determinano l'appiattimento e la protrusione.

Nei soggetti affetti da SD la superficie dorsale della lingua si presenta solitamente secca e screpolata a causa della respirazione orale. La lingua può assumere anche aspetto “scrotale”, in questo caso, sulla superficie dorsale dei due terzi anteriori della lingua può essere visibile una singola fissurazione lungo la linea mediana o fissurazioni doppie o multiple, con caratteristiche diverse di lunghezza e profondità. Le fessure possono essere facilmente occupate da residui di cibo e causare alitosi; questa può essere controllata mediante un regolare spazzolamento della superficie dorsale della lingua. Nei soggetti con Ts21 questa caratteristica può presentarsi in associazione alla “lingua a carta geografica” (68).

### ANOMALIE FUNZIONALI

L'ipotonia muscolare, nei soggetti affetti da SD, colpisce tutti i distretti del corpo e tende a migliorare con l'età. L'ipotonia del muscolo massetere, dello zigomatico, del temporale e degli orbicolari, influenza pesantemente il bilancio delle forze richieste per un normale sviluppo del distretto oro-facciale.

La riduzione dell'efficienza muscolare determina anche una minore coordinazione masticatoria che esita in una più difficoltosa detersione spontanea degli elementi dentali. La masticazione è frequentemente rimpiazzata da un movimento di suzione-schiacciamento in cui la lingua spinge il cibo contro il palato. Spesso il cibo viene ingoiato senza una sufficiente



triturazione, in quanto la posizione dei denti inferiori è inadatta ad esercitare una sufficiente forza masticatoria. I bambini con Ts21 possono presentare morso chiuso (i denti inferiori sono arretrati rispetto ai superiori) con mento retruso: in questi soggetti la fatica nel masticare è minore, poiché i muscoli possono esercitare più forza. Il labbro inferiore è ipotonico e frequentemente subisce un processo di eversione in seguito a protrusione linguale. L'ipotonia della muscolatura orbicolare delle labbra determina un sigillo labiale insufficiente. Per quanto riguarda la deglutizione, nei soggetti Down la transizione fra deglutizione infantile ed adulta, che normalmente avviene fra i 3 e i 5 anni, ritarda notevolmente, o addirittura può non verificarsi mai. La necessità di coordinare deglutizione e respirazione orale, induce spesso i pazienti ad attuare strategie diverse: alcuni riducono la masticazione al minimo e trangugiano rapidamente il cibo per poi respirare; altri triturano il cibo molto lentamente, interrompendo più volte la masticazione per respirare. Un altro dei disturbi correlati alla sindrome è il bruxismo che è presente nel 50% dei casi. Il bruxismo è una comune manifestazione che inizia precocemente nell'infanzia e qualche volta persiste nel corso della vita.

Inizialmente il bruxismo causa l'eliminazione di alcuni dei solchi secondari e terziari e delle fessure che si trovano nei denti erotti da poco ed in casi eccezionali può portare ad un sovraccarico dei tessuti di supporto ed alla conseguente distruzione parodontale.

Nei giovani pazienti, forme di bruxismo di tipo "transitorio" non sono infrequenti. Nei bambini in età prescolare, il bruxismo raramente richiede un trattamento attivo. I fattori eziologici legati al manifestarsi di questo disturbo possono essere molteplici; i pazienti hanno spesso una malocclusione severa, una disfunzione dell'articolazione temporo-mandibolare compatibile con la presenza di lassità ligamentosa, un insufficiente controllo neuro-muscolare, e uno stato di stress e di ansia cronico. Negli adulti con usura dentale severa da bruxismo, si può far confezionare un bite, al fine di prevenire un danno ulteriore ai tessuti dentali.

I soggetti affetti da Trisomia 21 per le loro caratteristiche fisionomiche e funzionali quali:

- tono muscolare relativamente basso,
- rinofaringe stretto
- lingua larga ed ipotonica

e per la loro tendenza all'obesità ed a sviluppare ricorrenti infezioni a livello tonsillare, sono più predisposti rispetto al resto della popolazione a presentare apnea sia di origine centrale che di tipo ostruttivo (50).

Nella Ts21 l'incidenza stimata di apnea notturna di origine centrale è molto alta (89% dei casi), mentre l'Apnea Ostruttiva del Sonno (OSAS) presenta una frequenza variabile dal 30 al 60%. L'OSAS è una patologia caratterizzata da ripetuti episodi di completa o parziale ostruzione delle vie aeree superiori durante il sonno, normalmente associati ad una riduzione della saturazione di ossigeno nel sangue (37; 80). Il trattamento chirurgico, tonsillectomia e adenoidectomia, rappresenta spesso la prima scelta terapeutica, ma nel 30-50% dei soggetti la problematica persiste nonostante l'intervento (18; 19; 40).

### ANOMALIE DENTALI

Le anomalie dentali nei soggetti affetti da SD sono legate all'anomalia cromosomica responsabile di una diminuita attività delle cellule mitotiche progenitrici del tessuto dentale durante l'embriogenesi. Esse sono frequenti ed includono anomalie di numero, forma e dimensione dei denti (41).

Caratteristica della SD è il ritardo di eruzione sia della dentatura decidua che permanente. Di frequente riscontro, per quanto riguarda la dentizione decidua, è il ritardo di almeno 6 mesi nella comparsa in arcata dei frontali (35). L'eruzione del primo dente deciduo avviene tra i 6 ed i 12 mesi nel 36% dei casi e nel 64% dei casi avviene dopo l'anno di età.

La frequenza di eruzione degli elementi decidui è spesso anomala: nel 20% dei casi infatti erompono per primi l'incisivo centrale superiore ed il primo molare. La dentatura decidua di solito è completa attorno ai 4-5 anni.

Per quanto riguarda la dentizione permanente, anch'essa è ritardata in media di circa 12 mesi. Il ritardo è comunque variabile da soggetto a soggetto, in sintonia con il ritardo generalizzato di crescita che il bambino presenta.

I molari e gli incisivi inferiori possono non apparire in arcata prima degli 8-9 anni e non è raro che i denti permanenti, soprattutto gli incisivi, erompano senza la caduta del corrispondente dente deciduo.

I casi di agenesie e di alterato sviluppo dentale, sia in dentatura decidua che permanente, sono dieci volte più frequenti nella SD rispetto alla popolazione generale. I maschi generalmente sono colpiti da agenesia più frequentemente rispetto alle femmine e gli elementi mandibolari sono più interessati di quelli mascellari (14).

Gli elementi più spesso in agenesia sono gli incisivi centrali inferiori, seguiti dagli incisivi centrali superiori e dai secondi premolari sia superiori che inferiori mentre canini e primi molari sono raramente interessati.

Nella popolazione generale, l'incidenza di elementi dentali soprannumerari è approssimativamente dello 0,3%, nella SD l'incidenza di questo fenomeno aumenta, ma la frequenza è inferiore rispetto alla percentuale di agenesie.

Fenomeni di affollamento dentale non sono rari e sono più frequenti nell'arcata mascellare rispetto a quella mandibolare (74).

Frequenti sono anche le anomalie di forma e dimensione. Per quanto riguarda la dentatura decidua, il diametro mesiodistale degli incisivi, del canino e del primo molare si presentano solitamente aumentati rispetto alla norma.

I pazienti affetti da sindrome di Down presentano microdonzia a carico della dentatura permanente dal 35 al 55% dei casi. Frequenti sono le anomalie di posizione dei permanenti, dovute spesso ad una ritardata perdita fisiologica dei decidui.

Fenomeni di ipoplasia e ipocalcificazione sono molto comuni (75).

A seconda del grado di ipoplasia e di decalcificazione dello smalto è possibile predisporre, come misura preventiva, l'applicazione topica di composti fluorati e, come soluzioni terapeutiche, cure conservative o ricoperture coronali protesiche.

Il taurodontismo è un fenomeno per cui la camera pulpare dei denti si presenta allungata e vi è un dislocamento apicale della biforcazione o della triforcazione delle radici. In persone affette da SD questa anomalia si presenta più frequentemente rispetto alla norma (con una percentuale che a seconda degli studi può variare dallo 0,54% al 5,6%). Il secondo molare mandibolare è il più soggetto a tale malformazione, seguito dal primo molare e quindi dal terzo molare.

Un dente "taurodontico" si forma quando il diaframma epiteliale non riesce ad invaginarsi completamente a livello orizzontale o la sua invaginazione è in ritardo rispetto allo sviluppo del dente; nella SD questo fenomeno si presenta con più facilità a causa dell'elevato numero di alterazioni a carico della membrana cellulare ed al rallentamento dei tassi di proliferazione (14).

### APPROCCIO ODONTOSTOMATOLOGICO

L'approccio odontostomatologico al bambino Down, richiede un trattamento multi ed interdisciplinare:

- riabilitazione funzionale
- terapia nutrizionale
- controlli otorinolaringoiatrici
- controlli oftalmologici
- controlli odontoiatrici.

Fondamentale è la prevenzione primaria nei confronti delle patologie cariosa e parodontale, la riabilitazione funzionale del distretto orofacciale, la correzione ortopedica della discrepanza scheletrica e la correzione ortodontica della malocclusione dentale. Occorre inoltre fornire ai genitori informazioni sulle caratteristiche di sviluppo del cavo orale proprie della sindrome, consigli sulla corretta alimentazione e indicazioni relative all'utilizzo di fluoro topico e sistemico.

In caso si presenti la necessità di attuare manovre odontoiatriche a rischio in pazienti con SD affetti da cardiopatia congenita, è imperativo effettuare, secondo tempi e modi concordati con il cardiologo e in base alla severità della cardiopatia, la profilassi antibiotica per l'endocardite batterica.

*L'American Heart Association* ha pubblicato le nuove linee guida sulla profilassi dell'endocardite batterica. In esse si raccomanda di sottoporre a profilassi antibiotica solo i soggetti a rischio più elevato di subire esiti avversi da endocardite.

I soggetti da profilassare prima di una procedura odontoiatrica di qualsiasi tipo sono:

- pazienti con protesi valvolari cardiache
- pazienti con precedente endocardite infettiva
- trapiantati cardiaci che sviluppano una valvulopatia cardiaca
- soggetti con alcune forme di cardiopatia congenita (cardiopatia congenita cianotizzante non corretta chirurgicamente, fino a 6 mesi dopo un intervento per cardiopatia congenita corretta chirurgicamente, cardiopatia congenita riparata ma con difetto residuale).

Per la bassa incidenza di complicanze legate all'insorgenza di endocardite batterica, nei soggetti affetti da Prolapso della Valvola Mitrale, la profilassi non è più consigliata. Lo schema antibiotico suggerito dalla AHA prevede l'assunzione di Amoxicillina (2g negli adulti, 50 mg/kg nei bambini) da 30 a 60 minuti prima della procedura. Nei soggetti allergici alla penicillina sono consigliati Azitromicina o Claritromicina (500 mg negli adulti, 15 mg/kg nei bambini), oppure Clindamicina (600 mg negli adulti, 20 mg/kg nei bambini) o Cefalexina (2g negli adulti, 50 mg/kg nei bambini). Tuttavia la cefalexina non deve essere usata in soggetti con storia di anafilassi, angioedema o orticaria da penicilline.

## **Capitolo 3**

## **Capitolo 3**

### **3.1 “Microbiologia del cavo orale”**

Durante la vita fetale l'organismo non possiede una flora microbica orale vera e propria, dal momento che la placenta impedisce il passaggio dei microrganismi.

Il neonato viene a contatto con i microbi provenienti dal tratto genito-urinario della madre al momento del parto e nelle ore e nei giorni seguenti con i germi trasmessi dalle persone e dall'ambiente circostante. Da questo momento in poi il cavo orale, insieme ad altri distretti dell'organismo quali cute ed apparato respiratorio, comincerà ad acquisire un suo complesso "ecosistema", costituito da diverse specie microbiche.

Quello che di primo acchito potrebbe sembrare un processo passivo, è in realtà un complesso e delicato sistema, fortemente regolato da un vincolo fatto di reciproci vantaggi: l'organismo umano fornisce substrati nutritivi alla propria flora batterica, che in cambio lo protegge dai patogeni, impedendo lo sviluppo di altri microrganismi nel medesimo habitat.

La cavità orale, colonizzata da microrganismi opportunisti (Batteri, Protozoi, Miceti e Virus), costituisce, dunque, un ecosistema dotato di un'elevata dinamicità dovuta alla continua eliminazione ed introduzione di batteri ed alimenti.

I principali fattori che influenzano l'ecosistema orale sono: l'igiene, le patologie associate al cavo orale, le condizioni fisiche del paziente e la dieta, in quanto alcune sostanze ingerite incidono sulla velocità di proliferazione dei batteri.

Il cavo orale per sua stessa anatomia e fisiologia costituisce un ambiente favorevole alla presenza e proliferazione di numerose specie batteriche, in quanto il dente offre una superficie di cellule di rivestimento non rinnovabili, che facilitano la colonizzazione da parte di una vasta gamma di specie batteriche e lo spazio gengivo-dentale costituisce un ecosistema di particolare interesse per la colonizzazione batterica.

Il cavo orale è inoltre un ambiente caratterizzato da un livello di umidità e temperatura che contribuiscono a renderlo un habitat estremamente vario.

In condizioni patologiche, iposcialia o ascialia in cui il flusso salivare è notevolmente ridotto o completamente assente, si verificano profonde modificazioni dell'ambiente e di conseguenza della flora microbica commensale.

Pertanto, nonostante esista una popolazione batterica residente, occasionalmente si ritrovano nella cavità orale microrganismi che di solito colonizzano altri siti dell'ospite.

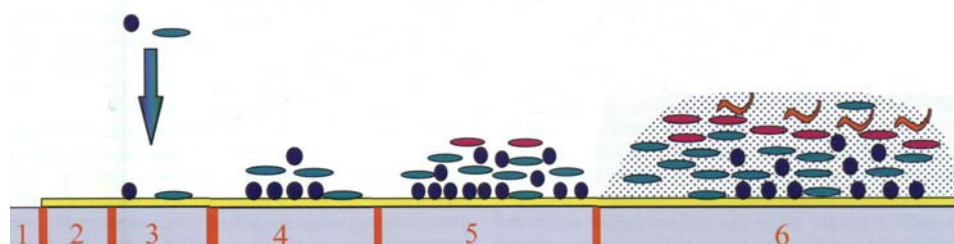
La colonizzazione, intesa come adesione transitoria e reversibile dei batteri al dente, viene distinta in due fasi: primaria e secondaria.

Nei processi che facilitano l'aggregazione dei batteri svolgono un ruolo fondamentale IgA e glicoproteine, che fungono da "fattori aggreganti", rappresentando così il primo passo per la formazione della placca.

#### FORMAZIONE DELLA PLACCA SOPRA E SUB-GENGIVALE

Il termine placca, derivato dall'impropria traduzione del termine inglese "PLACK", fa pensare alla placca come a qualcosa di duro, aderente e difficile da rimuovere.

In realtà è un biofilm sottile costituito da una componente acellulare (saccarosio, parti proteiche derivanti dalla scissione delle proteine contenute nella saliva ad opera d'enzimi litici prodotti dai batteri orali) e da una componente cellulare (aggregato di germi tenacemente adesi tra loro e alle superfici dentali).



**Figura 1: Rappresenta le varie fasi di formazione della placca: fase 1 – superficie del dente; fase 2 - deposizione della pellicola acquisita; fase 3 - adesione alla pellicola acquisita di batteri presenti nella saliva; fase 4 - replicazione batterica e formazione di microcolonie; fase 5 – arrivo dei colonizzatori secondari; fase 6 - maturazione della placca come complesso polispecifico in equilibrio.**



Nei primi momenti di formazione la placca è facilmente asportabile. Se non viene rimossa con le comuni manovre di igiene orale domiciliare, dopo circa tre settimane, a causa della precipitazione dei sali salivari (es. fosfati di calcio) si calcifica diventando tartaro.

Il tartaro, sopragengivale e sottogengivale, è definito come un insieme di depositi minerali fortemente adesi ai denti e colonizzati da batteri.

Il colore può variare dal giallo-biancastro delle concrezioni calcaree localizzate lungo il margine gengivale, al marrone scuro dovuto alla colorazione secondaria ad opera di tabacco e/o pigmenti derivati dal cibo, fino al nero del tartaro sottogengivale che si instaura ed aderisce più tenacemente alla superficie del dente, principalmente dovuto all'ossidazione del ferro di cui è ricca l'emoglobina del sangue, che si trattiene su tali depositi a causa del processo infiammatorio a carico dei tessuti gengivali.

Gli effetti negativi del tartaro sui tessuti di sostegno sono indiretti e consistono nella colonizzazione della sua superficie ruvida da parte di una flora batterica polimicrobica.

La capacità dei batteri di aderire alla superficie dei denti porta come conseguenza l'instaurarsi di patologie a carico dei denti stessi e dei tessuti che li circondano (54).

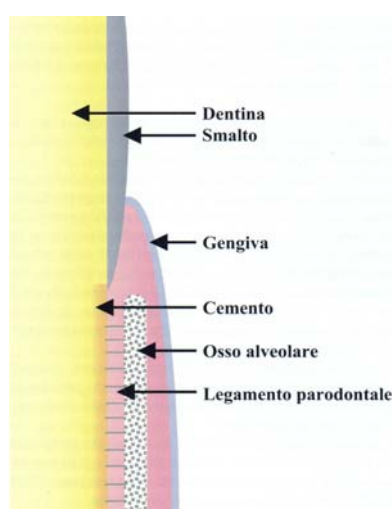


Figura 2: Tessuti di sostegno del dente

E' difficile identificare un solo microrganismo responsabile di una singola patologia, in quanto il cavo orale è un ambiente dove sono presenti almeno 300 specie batteriche differenti (21).

I primi batteri a colonizzare la superficie dentale sono cocchi Gram-positivi, principalmente *Streptococcus ssp.*, (38) ma anche cocchi Gram-negativi appartenenti ai generi *Veillonella* (*V. parvula* e *V. alcalescens*) e *Neisseria* (*N. sicca* e *N. catarrhalis*) e cocco-bacilli come le *Actinomytaceae*.

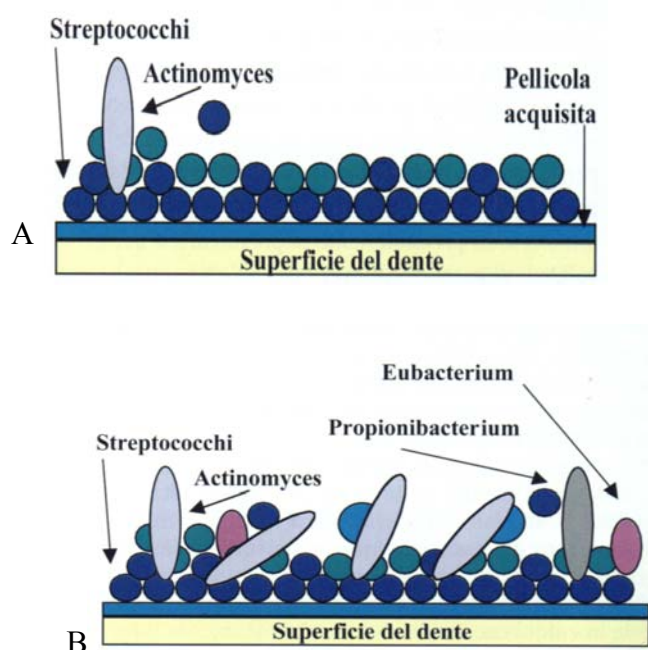


Figura 3 A/B: Adesione batterica nel processo di formazione della placca

In particolare *Streptococcus mutans*, un cocco, Gram-positivo, anaerobio facoltativo, è responsabile dell'adesività della placca batterica, in quanto è in grado di produrre un polimero extracellulare insolubile di natura polisaccaridica, denominato glucano, che svolge un ruolo importantissimo sia come mediatore dell'adesività del batterio stesso sia come molecola cementante per altri microrganismi. *S. mutans* libera l'enzima catalizzatore della formazione del glucano, la glucosil-transferasi (GTF), che svolge anch'esso il ruolo di mediatore dell'adesività in quanto è in grado di legarsi alla superficie dei denti, a quella di cellule batteriche e ad altri glucani.

*S. mutans* genera, dunque, un ambiente fortemente acido (pH=5) all'interno del cavo orale, favorendo così l'attecchimento e la crescita di un altro genere di microrganismi Gram-positivi, non sporigeni: i Lattobacilli.

*Lactobacillus acidophilus* e *L.casei* non aderiscono direttamente allo smalto, ma insieme allo *Streptococcus mutans*, sono i principali produttori di acido lattico, responsabile della demineralizzazione dello smalto.

Nel cavo orale sono presenti anche altre specie batteriche, quali *S. mitior*, *S. salivarius* e *S. sanguis*, appartenenti alla "flora commensale" che utilizzano come nutrienti sostanze prodotte da altre specie; *S. mutans*, per esempio, produce l'acido paraminobenzoico (PABA) che funge da fattore di crescita per lo *S. sanguis* (38; 53).

Gradualmente i microbi coccoidi vengono rimpiazzati dai batteri filamentosi. Si tratta fondamentalmente di microrganismi Gram-negativi anaerobi che colonizzano prevalentemente la regione subgingivale inducendo la formazione della tasca parodontale.

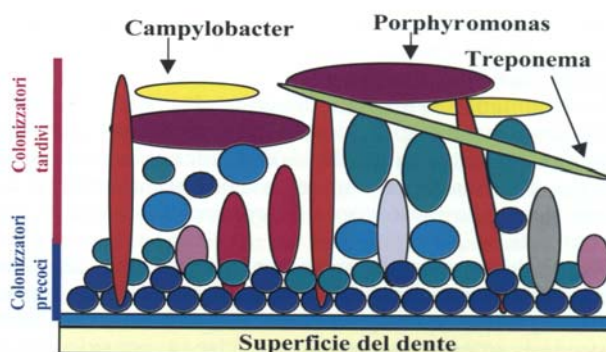


Figura 4: Colonizzazione batterica a livello subgingivale

L'estensione e la gravità delle lesioni parodontali è in rapporto con la composizione della flora sottogingivale.

A questo livello i batteri sembrano avere la capacità di penetrare nei tubuli dentinali, dopo esposizione di questi ultimi per via del riassorbimento del cemento in seguito allo stato infiammatorio.

I batteri parodontopatogeni rispondono ai cinque criteri di Socransky: associazione, eliminazione, patogenicità su animale, eliminazione di fattori di virulenza, stimolazione del sistema immunitario (55).

Numerosi studi mostrano come i principali batteri coinvolti nella malattia parodontale siano: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Veillonella parvula* e *Treponema denticola* (64).

Da studi effettuati sulla malattia parodontale si è ottenuta un'alta prevalenza di *P. gingivalis* e *P. intermedia*, suggerendo una maggiore associazione di questi parodontopatogeni con parodontiti giovanili rispetto ad *A. actinomycetemcomitans* (33).

*Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* sono bacilli Gram-negativi, immobili e anaerobi, sono tra i batteri parodontopatogeni meglio caratterizzati, presenti nel biofilm orale (43; 19; 24).

L'azione patogena di entrambi è data da tre principali fattori di virulenza: le fimbrie, le gingipaine ed il lipopolisaccaride.

L'associazione di *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), batterio Gram-negativo anaerobio, alla malattia parodontale ha ricevuto importanti conferme in questi ultimi anni.

*T. forsythia* è dotata, infatti, di diverse caratteristiche di virulenza che comprendono la produzione di una proteasi tripsino-simile ed del lipopolisaccaride (36; 57). Ha la capacità di entrare nelle cellule dell'ospite e di indurre apoptosi cellulare (7; 49).

La scoperta che *T. forsythia* è molto spesso ritrovata in associazione con *Porphyromonas gingivalis* ha confermato la possibilità che questo microrganismo possa penetrare nelle cellule dell'ospite (49).

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, bacillo Gram-negativo, immobile, saccarolitico, risulta essere particolarmente associato con la malattia parodontale localizzata aggressiva (59).

Possiede un importante fattore di virulenza, la leucotossina, che ha una sequenza molto simile all'alfa-emolisina di numerosi Gram-negativi (20) e che è in grado di uccidere i leucociti polimorfonucleati ed i monociti (10; 59) conferendo al batterio la capacità di invadere il tessuto gengivale mediante la produzione di collagenasi (48).

Studi effettuati su 'early onset periodontitis' (EOP) rivelano come *P. gingivalis* e *T. denticola* sono particolarmente importanti rispetto ad altri batteri parodontopatogeni e che potrebbero giocare un ruolo significativo in forme gravi e progressive di EOP (1).

*Treponema denticola* risulta essere fortemente associato a processi infiammatori a carico del parodonto che in alcuni casi possono aggravarsi sfociando in necrosi ulcerativa delle gengive e riassorbimento osseo alveolare (23). Numerosi studi hanno mostrato come *T.denticola* possieda una localizzazione prevalentemente subgengivale, in prossimità dell'epitelio giunzionale dove aderisce alle cellule ospite e alle proteine della matrice cellulare (27; 35; 40; 52; 60; 63).

Mediatori dell'effetto citopatico di *T. denticola* sembrano essere gli antigeni di superficie presenti sulla membrana esterna. Tra questi l' MSP (major surface protein) e la CTLP ( chymotrypsin-like-protein) hanno mostrato la capacità di aderire e ledere le cellule dell'epitelio parodontale (23).

La composizione lipidica della membrana, le diverse adesine presenti sulla superficie cellulare e numerosi enzimi idrolitici, incluse proteasi (simili alla chimotripsina), contribuiscono in maniera significativa al processo d'infezione (45; 61; 63).

Nei batteri coinvolti in questo genere di infezione, inoltre, la locomozione e l'adesione sono in genere considerati importanti fattori di virulenza (58). I treponemi sono infatti batteri dotati di un elevato potere invasivo grazie proprio alla loro unica motilità e alla loro capacità di penetrare nelle cellule in monostrato (6). Tra i meccanismi che sono alla base di tale processo infettivo è stata ipotizzata la capacità di *Treponema denticola* di evadere la risposta immunitaria naturale, evitando la fagocitosi da parte delle cellule macrofagiche.

La presenza dei microrganismi da sola non è sufficiente a produrre le distruzioni che si verificano a carico dei tessuti di supporto dei denti.

La flora batterica infatti innesca una complessa risposta immunitaria (cascata citochimica) di difesa a stimoli irritanti nell'organismo ospite, la quale, in ultima analisi, è responsabile della distruzione che si verifica a carico dei tessuti parodontali (8).

## FLORA MICROBICA E PATOLOGIE DEL CAVO ORALE NEI PAZIENTI SINDROMICI

Numerosi studi mostrano come la flora batterica del cavo orale vari in relazione alle diverse patologie cui un individuo è soggetto.

La carie dentale è la più comune patologia del cavo orale e coinvolge gran parte della popolazione mondiale. Numerose ricerche individuano nell'accumulo di placca batterica (31) ed in fattori legati all'ospite ed alla dieta la principale causa di sviluppo di carie (26).

Quali siano realmente i fattori predisponenti alla patologia cariosa non è ancora del tutto chiaro, ma si pensa che nella sua insorgenza svolga un ruolo importante l'azione protettiva della saliva.

In soggetti sani in età evolutiva le forme di patologia cariosa sono principalmente correlate alla presenza di *S. mutans* e *S. sobrinus* (9; 12; 13; 16). Alcuni studi dimostrano come la sola presenza di *S. mutans* da sola non sia sufficiente per predire la formazione di carie dentale nei bambini (14; 31), ma spesso si ha l'associazione di altre specie patogene capaci di aderire alla superficie del dente, come lo *S.sanguinis* (9; 34). Studi successivi agli anni '80 mostrano proprio come la presenza di *S.mutans* e *S.sanguinis* in diverse percentuali possano fornire informazioni corrette sulla predisposizione al rischio di carie, se si considera per esempio l'attività antagonista giocata dallo *S.sanguinis* nei confronti dello *S. mutans* (16; 32).

Pazienti sindromici mostrano una maggiore suscettibilità alla malattia parodontale, che il più delle volte evolve rapidamente (39).

Nella predisposizione alle patologie del cavo orale in questa tipologia di pazienti giocano un ruolo fondamentale le alterazioni a livello immunitario e a livello del tessuto connettivo.

In presenza di un' alterata risposta immune, il danno può dunque risultare come una conseguenza indiretta di alterazioni a livello di altri distretti (39).

I fattori predisponenti le patologie più o meno gravi a carico del cavo orale nei pazienti disabili si identificano in primis nella scarsa igiene orale, nella scarsa collaborazione nelle normali manovre di bonifica del cavo orale, nella difficoltà nella masticazione ed in una dieta quasi sempre ricca di dolci (3), il che molto

spesso si traduce in un danno può interessare i denti con i loro tessuti di sostegno e la mucosa di rivestimento.

Le patologie a carico dei tessuti molli del cavo orale riguardano principalmente la mucosa di rivestimento di labbra, guance e pavimento orale (stomatopatie) e la mucosa specializzata della lingua (glossopatie). Le cause patogene sono pressoché le stesse in entrambi i casi; cambia soltanto l'aspetto clinico in rapporto alla sede in cui si manifesta la lesione.

Le forme flogistiche frequentemente interessano tutti i tessuti orali (stomatiti e gengivostomatiti) e possono dipendere da cause non infettive ed infettive.

Tra le forme non infettive la più nota è la stomatite aftosa, che è la malattia più comune della mucosa del cavo orale. La causa è sconosciuta, anche se sicuramente è da collegarsi a un'anormalità immunologica. Clinicamente si manifesta con ulcere superficiali ricorrenti (afte), spesso isolate, che compaiono in rapporto a fattori causali, quali disturbi gastroenterici o psicosomatici, scompensi ormonali, traumatismi, carenze di ferro o di vitamine del gruppo B. Le lesioni si risolvono spontaneamente nell'arco di 3-4 giorni. Le cause infettive delle infiammazioni del cavo orale, invece, possono essere virali, batteriche e micotiche.

Tra le virali rientra l'infezione da *Herpes simplex*, che compare frequentemente nella prima infanzia e si presenta con numerose vescicole che, una volta rotte, formano delle piccole ulcerazioni molto dolorose; tali lesioni si accompagnano ad adenopatia regionale e iperpiressia.

I pazienti disabili, inoltre, sono soggetti a continui traumatismi delle mucose orali involontari e non, che spesso possono generare delle sovrainfezioni di natura batterica e micotica (47; 51).

L'utilizzo in età pediatrica di terapie farmacologiche, soprattutto se di lunga durata, può indurre alterazioni della flora batterica orale con conseguente sviluppo di micosi opportunistiche come la candidosi e ulcerazioni di varia severità.

La *Candida albicans* è la specie patogena più importante del genere *Candida*, fungo saprofito appartenente alla famiglia *Saccharomycetaceae*. È un lievito di piccolissime dimensioni, cresce sotto forma di colonie rotondeggianti ed in vitro non produce ife.

La colonizzazione è legata alla capacità di *C.albicans* di aderire all'epitelio delle mucose mediante strutture fibrillari costituite da peptidomannani.

In soggetti sani questo microrganismo è presente in quantità numericamente insufficiente per esplicare la sua attività patogena. Quando la carica aumenta, per esempio a causa di un temporaneo calo delle difese immunitarie, può dare origine a specifiche condizioni patologiche (es. mughetto) frequenti nei pazienti in età evolutiva e nei pazienti sindromici.

Studi effettuati mostrano la presenza di *C. albicans* in campioni salivari di pazienti affetti da Sindrome di Down e la capacità di *C. albicans* di aderire all'epitelio della mucosa orale grazie alla presenza di polisaccaridi prodotti dalle diverse specie di streptococchi, generando una sorta di "co-aggregazione" (29).

E' stato dimostrato il coinvolgimento di *C.albicans* in fenomeni di lesioni della mucosa orale e alterazione dell'ecosistema orale, post profilassi o terapia con steroidi prolungata per via inalatoria, in pazienti asmatici che risultano di conseguenza essere maggiormente predisposti a candidosi oro-faringea (22; 44).

Casi di candidosi sono fortemente associati anche ad immunodeficienze secondarie.

Il paziente sieropositivo per HIV o in fase di AIDS conclamato, infatti, è fortemente soggetto a stomatiti di origine micotica, virale o batterica (18).

La candidosi orale associata a HIV virus si presenta frequentemente anche nelle fasi iniziali della malattia, come patina bianca asportabile diffusa a tutto il cavo orale con particolare coinvolgimento del palato e della lingua (2).

Non trattare tali lesioni contribuisce ad aumentare la morbilità associata all'AIDS (42): in questo caso si rischia di favorire l'instaurarsi di una esofagite da *Candida spp.*

E' indispensabile, dunque, identificare l'agente eziologico responsabile della candidosi al fine di impostare un trattamento antimicotico mirato ed evitare l'insorgenza di farmaco-resistenze.

L'uso di apparecchi ortodontici può essere causa della modificazione del biofilm e dell'ecosistema (30; 37).



In caso di stomatite da *Candida spp* legata all'uso di apparecchi ortodontici, i pazienti devono curarne la pulizia in maniera accurata ed evitarne l'utilizzo nelle ore notturne e nel corso del trattamento farmacologico.

I microrganismi maggiormente responsabili della patologia cariosa sono lo *Streptococcus mutans* e il *Lactobacillus* che, come tutti i batteri cariogeni, producono acidi organici fermentando carboidrati e sono responsabili della demineralizzazione del dente, momento iniziale del processo carioso.

Il fenomeno "carie" risulta evidente in pazienti affetti da patologie sistemiche correlate a gravi forme di ritardo mentale; al contrario sembra essere meno rilevante in pazienti oncoematologici e pazienti affetti da morbo celiaco ed in pazienti affetti da sindromi più rare.

I pazienti affetti dalla Sindrome di Noonan, per esempio, non mostrano una spiccata suscettibilità alla patologia cariosa, ma diversi studi in letteratura mostrano come la carie in questi pazienti possa comunque insorgere e come, in alcuni casi, possa evolvere in tempi abbastanza rapidi, a causa di diversi fattori, quali reflusso gastro-esofageo, vomito e frequente assunzione di cibi e bevande molto zuccherate (11).

Un lavoro condotto su pazienti affetti da Craniosinostosi mostra come questa tipologia di pazienti sia nettamente meno soggetta alla patologia cariosa, rispetto ad un gruppo controllo utilizzato per lo studio.

Numerosi studi clinici e sperimentali hanno evidenziato la presenza di una forte associazione fra le parodontiti e alcune malattie sistemiche, dimostrando come pazienti soggetti a suddetti disordini siano maggiormente suscettibili alla malattia parodontale rispetto a soggetti sani.

In relazione al grado di alterazione che si ha a livello sistemico si può avere un quadro più o meno severo di disagio parodontale, che si sviluppa dunque come "prima infezione" o come "l'aggravarsi di una condizione già data" attribuibile a fattori locali, come l'accumulo di placca batterica (39)

A riguardo la letteratura riporta opinioni discordanti, in quanto alcuni autori sostengono che l'accumulo di placca batterica sul dente sia una condizione necessaria e sufficiente per lo sviluppo della malattia parodontale e che i disordini sistemici accelerino solamente la progressione della malattia;

altri ritengono non ci sia una evidente dimostrazione di come l'accumulo di placca batterica possa indurre un processo di questo tipo, dal momento che non è mai stata stabilita una relazione causa-effetto tra il tipo di placca e severità del danno parodontale.

In realtà una correlazione tra malattia sistemica e suscettibilità alla parodontite esiste.

Diversi studi dimostrano come nei pazienti affetti da Sindrome di Down (SD) la possibilità di sviluppare parodontite aumenti a causa della diminuzione dell'espressione di glicoproteine di superficie dei neutrofilo importanti per il riconoscimento del microrganismo responsabile (39).

La SD è infatti caratterizzata da un aggressivo e generalizzato stadio di parodontopatia, che si traduce in una progressiva distruzione dei tessuti di sostegno dei denti.

Tra i principali batteri parodontopatogeni *Actinomyces actinomycetemcomitans* e *Capnocytophaga ssp* risultano maggiormente coinvolti nella parodontite in pazienti con trisomia 21 (39).

Circa l'8% di pazienti affetti da questa sindrome soffre di parodontite a partire dai 12 anni di età e la prevalenza del disagio parodontale tende ad aumentare fino al 60%-100% con l'aumentare dell'età (39).

Uno studio effettuato su un gruppo di pazienti con SD, stratificando per età, dimostra come la composizione della microflora subgingivale vari in relazione al periodo in cui il paziente sviluppa la parodontite. In particolare, nel periodo dell'adolescenza si ha una elevata prevalenza per *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. intermedia*, *C. sputigena* e *A. naeslundii II*. Nei pazienti adulti prevalgono *E. corrodens*, *P. nigrescens* e *P. micron* (50).

Oltre alla SD, altre malattie sistemiche caratterizzate da grave ritardo mentale possono aumentare il rischio di sviluppo e progressione delle parodontopatie.

La malattia parodontale può infatti manifestarsi in forme differenti in relazione alla sindrome.

Nella Sindrome di Marfan la parodontite si manifesta in una forma severa cronicizzata con presenza di placca dentaria ed evidente riassorbimento osseo, fattore che induce ad una elevata mobilità dell'elemento dentario (56).

Nel caso della sindrome di Ehler-Danlos uno stadio di parodontite severa può essere associato alle sindromi di tipo I, VII, III o IV (41) nonostante attualmente tale predisposizione sia stata descritta soltanto con la sindrome di tipo I. Si suppone che alla base di questa patologia ci sia una alterazione nel collagene di tipo III, che si traduce in una mancata integrità a livello delle giunzioni parodontali (41).

La malattia parodontale nella sindrome di Chediak-Higiashi si manifesta con uno stato di infiammazione a carico del tessuto gengivale, con riassorbimento osseo esteso o localizzato a seconda dei casi ed una prematura esfoliazione del dente, dovuto principalmente all'accumulo in sede di batteri anaerobi Gram negativi, primi tra tutti le spirochete, che abbondano in caso di infezione purulenta e che, grazie alla loro azione proteolitica, facilitano l'adesione da parte di altri microrganismi (39).

Nella Sindrome di Papillon-Lefèvre si ha un aggressivo stato infiammatorio a livello gengivale con conseguenze perdita sia della dentizione decidua che permanente, che sembra essere dovuta ad un'alterata risposta immune ed all'accumulo a livello della tasca parodontale di *Actinomyces actinomycetemcomitans* (62).

Lo sviluppo della parodontite è dovuto dunque ad una suscettibilità individuale legata ad una base genetica e agli stili di vita che permette ai batteri di esprimere il loro potenziale patogeno.

Questa suscettibilità definisce perciò la porzione della popolazione ad alto rischio di ammalare di parodontite.

La prevenzione delle patologie del cavo orale risulta oggi, dunque, un obiettivo da perseguire di primaria importanza e rappresenta il primo gradino nella scala dell'informazione sanitaria in odontoiatria.

La difesa migliore consiste nella prevenzione e nella capacità di controllare la formazione e il deposito della placca batterica. E' necessario ridurre la formazione di placca attraverso un'alimentazione povera di zuccheri, in particolare quelli raffinati e appiccicosi, e fare in modo che questa venga eliminata dai denti e dalle gengive eseguendo una pulizia ottimale in quantità e qualità. E' necessario ricorrere al dentista laddove filo e spazzolino non sono più efficaci.

### 3.2 SCOPO DELLA RICERCA

Il benessere orale rappresenta per l'individuo disabile un obiettivo a cui tendere, in quanto la bocca, oltre ad assolvere funzioni vitali, è il mezzo talvolta unico con cui poter comunicare con l'ambiente circostante.

Lo stato di salute orale può essere influenzato da fattori sia anatomici che sistemici, che possono prescindere o meno dal mantenimento di un buon livello di igiene orale.

Nei soggetti affetti da patologie sistemiche responsabili di disabilità fisiche e/o psichiche, la salute orale risulta fortemente compromessa, soprattutto in età evolutiva.

Diversi studi riportati in letteratura, dimostrano come i pazienti disabili siano fortemente più suscettibili alle diverse patologie che si riscontrano nel cavo orale, rispetto ai soggetti con anamnesi medica negativa; dato, questo, rinforzato dalla pratica clinica.

Risulta tuttavia fondamentale chiarire il complesso rapporto tra la popolazione microbica e l'ospite nello stato di malattia.

La maggior parte degli studi presenti in letteratura che descrivono la flora batterica orale e sub gengivale di pazienti disabili in età evolutiva si avvale di metodiche di indagine di tipo colturale, che, nella ricerca di microrganismi anaerobi, possono risultare insufficienti rispetto alle più sensibili tecniche diagnostiche di tipo molecolare.

Scopo dello studio è stato quello di caratterizzare la flora microbica orale su due gruppi di pazienti in età evolutiva, affetti da patologie sistemiche differenti, sulla base di un profilo microbiologico stilato a partire da tamponi salivari e prelievi parodontali, confrontando i valori con quelli ricavati da pazienti in età evolutiva con anamnesi medica negativa, al fine di valutare se una colonizzazione precoce del cavo orale da parte di questi microrganismi si abbia o meno già nella prima infanzia.

La risposta al quesito, se positiva, fornirebbe una ulteriore conferma alla predisposizione di questi pazienti alle patologie del cavo orale.

## **Capitolo 4**

## **Capitolo 4**

### **MATERIALI E METODI**

#### **4.1) GRUPPI DI STUDIO**

Lo studio è stato condotto su due differenti popolazioni:

- 1) una popolazione di 27 soggetti in età evolutiva affetti da DS, di età compresa tra i 2 e i 16 anni (età media 5,48), 12 maschi e 15 femmine.
- 2) una popolazione di 17 soggetti in età evolutiva affetti da EDs, di età compresa tra i 2 e i 16 anni (età media 5,48), tutti maschi.

I due gruppi di studio sono costituiti da pazienti afferenti al Servizio di Odontoiatria per Disabili del Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche dell'Università degli Studi di Bologna inviati per consulenza odontoiatrica dai Reparti di Pediatria del Policlinico Universitario Sant'Orsola-Malpighi di Bologna.

Nella selezione dei pazienti appartenenti al gruppo di studio 1 sono stati utilizzati i seguenti criteri di inclusione:

- diagnosi accertata di Trisomia 21
- età compresa tra i 2 e i 18 anni
- igiene orale professionale e terapia antibiotica non eseguite nel trimestre precedente
- pazienti non in corso di terapia ortopedica–ortodontica.

Nella selezione dei pazienti appartenenti al gruppo di studio 2 i criteri di inclusione utilizzati sono stati:

- diagnosi accertata di Displasia Ectodermica
- età compresa tra i 2 e i 18 anni.
- igiene orale professionale e terapia antibiotica non eseguite nel trimestre precedente

I genitori dei pazienti, informati in modo dettagliato e scrupoloso sullo scopo e sui metodi che lo studio prevede, hanno sottoscritto il consenso informato.

Lo studio è stato condotto utilizzando come controllo 2 gruppi costituiti da 46 soggetti (17 maschi e 29 femmine) di età compresa tra 4 e 17 anni (età media 8,87), con le seguenti caratteristiche:

- anamnesi medica negativa,
- igiene orale professionale e terapia antibiotica non eseguite nel trimestre precedente,
- pazienti non in corso di terapia ortopedica–ortodontica.

#### **4.2) INDAGINI CONDOTTE**

I soggetti appartenenti rispettivamente ai due gruppi selezionati sono stati sottoposti a:

- valutazione dello stato di salute del cavo orale
- prelievi salivari mediante utilizzo di tamponi sterili
- prelievo placca sottogengivale mediante coni di carta sterili da tre diversi siti
- esame colturale dei prelievi salivari
- esame molecolare sui prelievi di placca sottogengivale
- elaborazione statistica dei dati ottenuti sia dall' analisi colturale che molecolare.

#### 4.2.1) VALUTAZIONE DELLO STATO DI SALUTE DEL CAVO ORALE: GRUPPO 1

La valutazione dello stato parodontale è stata eseguita per gli elementi dentali sottoposti a prelievo di placca sottogengivale per l'esame molecolare.

I parametri clinici misurati sono i seguenti:

- profondità di tasca,
- sanguinamento al sondaggio,
- indice di placca.

La profondità di tasca è stata misurata utilizzando una sonda millimetrata a punta arrotondata con una sezione all'estremità di circa 0,4 mm.

Il sondaggio è stato eseguito inserendo delicatamente la sonda lungo il bordo gengivale a livello di 6 punti sulla circonferenza dell'elemento dentale (mesio-, medio-, disto- vestibolare e mesio-, medio-, disto-linguale).

Il sanguinamento al sondaggio è stato valutato osservando la comparsa di sanguinamento gengivale dopo il passaggio della sonda a livello del solco fino a 20 secondi dopo (Tabella 1)

<b>SANGUINAMENTO AL SONDAGGIO</b>	
(++)	Immediato sanguinamento al passaggio della sonda
(+)	Il sanguinamento si verifica dai 5 ai 20 secondi dopo il passaggio della sonda
(-)	Nessun sanguinamento

**Tabella 1:** Indici di valutazione del sanguinamento al sondaggio



L'indice di placca (Löe & Silness, 1963) non valuta l'estensione bensì il suo spessore a livello del margine gengivale; viene rilevato con una sonda e più precisamente:

- 0= assenza di placca;
- 1= presenza di un film aderente al margine libero gengivale ed alla superficie dentaria adiacente, la placca non è visibile ad occhio nudo;
- 2= modesto accumulo di depositi molli all'interno del solco gengivale, sul margine gengivale e/o sulla superficie dentaria adiacente, la placca è visibile ad occhio nudo;
- 3= abbondanza di materiale molle nelle stesse sedi descritte per il valore 2.

#### 4.2.2) VALUTAZIONE DELLO STATO DI SALUTE DEL CAVO ORALE: GRUPPO 2

Tutti i pazienti presentano al momento del prelievo un buono stato di salute orale, ed erano tutti soggetti a trattamento ortopedico-ortodontico.

#### **4.3) ESAME COLTURALE**

Il prelievo dei campioni salivari è stato effettuato mediante utilizzo di tamponi floccati con fibre di nylon sterili (COPAN Italia S.p.a.), specifici per la raccolta di campioni biologici, contenenti terreno di trasporto specifico per batteri sia aerobi che anaerobi.

Il tampone, in confezione sterile monouso, viene imbibito di saliva tenendolo nel cavo orale per circa 60 secondi.

Il prelievo salivare viene effettuato sfregando delicatamente il tampone sia sul dorso della lingua che alla base della stessa e successivamente riposizionato nella provetta con terreno di trasporto. Le provette vengono conservate ad una temperatura pari 4°C per un tempo massimo di 24 h.

Nel caso in cui gli esami microbiologici non si eseguissero entro le 24h il campione viene trasferito all'interno di un crio-vial e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$ , condizione che permette la conservazione del campione inalterato.

In laboratorio i campioni vengono riportati a temperatura ambiente e sottoposti a:

- valutazione del pH mediante cartine tornasole
- esame colturale: semina di  $10\mu\text{l}$  di campione mediante un'ansa sterile monouso su piastre contenenti terreni solidi (KIMA VACUTEST) quali:



Blood agar horse : crescita non selettiva di *Streptococchi di gruppo A, B e C*; *Pneumococchi* e *Stafilococchi*.



Agar Azide: crescita selettiva ed isolamento e la crescita ottimale di streptococchi e stafilococchi

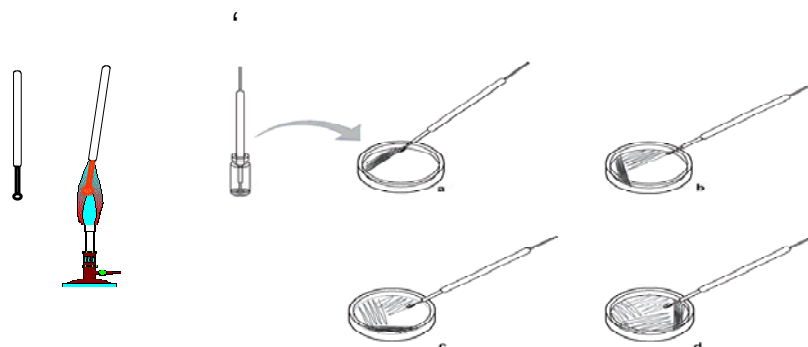


Chrom agar Candida: identificazione di colonie grazie alla specifica colorazione che assumono (Tabella 2).

Microrganismo	Aspetto tipico delle colonie
<i>C.albicans</i>	verde
<i>C.tropicalis</i>	blu metallico
<i>C.krusei</i>	rosa, lanuginose
Altre specie	da bianche a malva

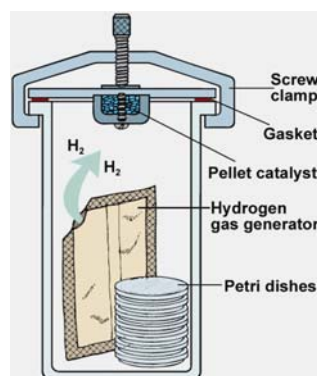
**Tabella 2:** Parametri di identificazione delle specie di *Candida*

Le piastre vengono seminate (Figura 1) e successivamente incubate a  $37^{\circ}\text{C}$  per 24 ore sia in condizioni aerobie che anaerobie.



**Figura 1:** Tecnica di semina a quattro quadranti su piastra.

Per garantire l'anaerobiosi è stata utilizzata un'apposita giara (Figura 2) nella quale viene riprodotta un'atmosfera priva di ossigeno mediata dalla presenza di un catalizzatore.



**Figura 2:** Giara per l'anaerobiosi.

Una prima lettura delle piastre viene effettuata dopo 24h distinguendo le diverse colonie in base a morfologia, pigmentazione e fluorescenza.

Accertata la crescita, si procede con l'isolamento delle singole colonie batteriche rilevate, allestendo sub-culture su piastre nuove, contenenti gli stessi terreni di coltura, che si lasciano ad incubare a 37°C nelle stesse condizioni di crescita fino al giorno seguente.

Le colonie così isolate vengono sottoposte ad identificazione mediante l'utilizzo del Sistema Automatico **VITEK®** (Figura 3).

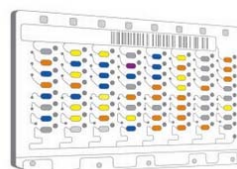


**Figura 3: Sistema Automatico VITEK®:** L'automazione garantisce ad una maggiore sicurezza ed elimina la ripetizione delle operazioni manuali, mentre la rapidità d'analisi consente una gestione più veloce dei risultati rispetto alle tecniche manuali.

Il sistema comprende:

- un modulo per il riempimento e la chiusura sigillata delle card;
- un modulo incubatore/lettore;
- un computer con un software specifico che monitora in continuo le operazioni in corso e memorizza, processa ed interpreta i risultati ottenuti.

Per l'identificazione vengono utilizzate delle apposite card VITEK (Figura 4) confezionate singolarmente per garantirne l'integrità prima del loro uso.



**Figura 4: Card VITEK®:** Queste card constano di diversi pozzetti contenenti 30 diversi substrati biochimici in forma disidratata e non necessitano di reagenti addizionali. In ogni pozzetto viene inoculata una goccia di sospensione batterica precedentemente preparata alla concentrazione di 0,5 McF.

Dopo l'inoculo batterico, la card viene sigillata ermeticamente in modo tale da poter essere maneggiata senza alcun rischio di contaminazione biologica del campione e dello sperimentatore e caricata sullo strumento.

L'identificazione del microrganismo viene effettuata grazie all'utilizzo di un database VITEK specifico capace di discriminare il microrganismo d'interesse in relazione alle reazioni biochimiche avvenute.

Il database VITEK copre oltre 300 specie sia di origine clinica che industriale.

#### 4.4 ESAME MOLECOLARE

L'esame molecolare fornisce un'analisi qualitativa della composizione della placca sotto-gengivale.

In particolare permette l'amplificazione in vitro di una sequenza di DNA target e di conseguenza l'identificazione dei cinque patogeni parodontali maggiormente coinvolti nei processi di distruzione dell'apparato di sostegno del dente:

- *Treponema denticola*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Prevotella intermedia*
- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
- *Tannerella forsythensis*

Il fluido crevicolare è stato prelevato a livello del solco parodontale con l'ausilio di coni di carta sterili (Mynol® MEDIUM).

Il cono di carta, prelevato con pinzette sterili dalla confezione, viene inserito nel solco gengivale per 2-3 secondi e dopo il prelievo immediatamente reinserto all'interno di una provetta contenente una soluzione tampone (TE buffer).

Nel nostro studio sono stati effettuati per ogni paziente tre prelievi in tre siti specifici:

- Solco mesio-buccale del primo molare superiore permanente o secondo molare superiore deciduo
- Solco vestibolare dell' incisivo centrale superiore permanente/deciduo
- Solco linguale dell' incisivo centrale inferiore permanente/deciduo

#### 4.4.1 ESTRAZIONE DEL DNA BATTERICO

Il DNA batterico è stato estratto dai campioni di fluido crevicolare utilizzando l'estrattore automatico di acidi nucleici NucliSENS easyMAG (Biomerieux, France) (Figura 5).

Una volta in laboratorio i campioni di fluido crevicolare sono stati vortexati. Da questi sono stati quindi prelevati 200  $\mu$ l ai quali sono stati aggiunti 2 ml di Lysis Buffer (LB). I campioni sono stati poi lasciati ad incubare con il LB per 10 minuti a temperatura ambiente, dopo di che è stata addizionata, ad ogni campione, un'aliquota di silice, diluita precedentemente 1:1 con acqua distillata, pari a 100  $\mu$ l.

Il tutto è stato trasferito all'interno di contenitori di plastica sterili monouso appositi e caricato sullo strumento. Si è ottenuto così un eluato di 55  $\mu$ l che verrà poi utilizzato per le successive reazioni di amplificazione.



**Figura 5:** Estrattore automatico di acidi nucleici NucliSENS easyMAG (Biomerieux, Fr)

#### 4.4.2 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

I campioni di DNA batterico sono stati sottoposti ad amplificazione mediante reazione di polimerizzazione (PCR) utilizzando primers universali specifici per la ricerca dei patogeni d'interesse, che per *T.denticola*, *P. gingivalis*, *P.intermedia* e *T. forsythensis* amplificano il gene che codifica per la subunità ribosomiale 16S rRNA, mentre per *A.actinomycetemcomitans* amplificano la porzione centrale del gene della leucotossina (*lktA gene*).

La mix di amplificazione è costituita da diversi reagenti i quali svolgono una funzione ben precisa esplicitata nella tabella seguente:

REAGENTI	FUNZIONE
<b>Taq buffer</b>	Garantire la massima efficienza di reazione e facilitare l'incorporazione nel DNA di nucleotidi marcati o modificati
<b>dNTP mix</b>	Fornire i nucleotidi necessari per l'amplificazione della sequenza di DNA specifica per quel determinato microorganismo
<b>Primer 1</b>	"Inneschi" costituiti da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi) complementari agli estremi 5' e 3' del segmento da riprodurre
<b>Primer 2</b>	
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Costituire l'ambiente adatto alla reazione
<b>Taq DNA Polymerase</b>	Catalizzare la reazione di polimerizzazione
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Mezzo di reazione
<b>DNA template</b>	Campione di DNA da analizzare

**Tabella 3:** Reagenti Mix PCR

Ricerca di *Treponema denticola*

Per le reazioni di amplificazione viene preparata per ciascun campione una mix di reazione contenente tutti i reagenti riportati in tabella 4 nelle rispettiva quantità e concentrazioni:

REAGENTI	QUANTITA' (µl)
10X Taq buffer	3
2mM dNTP mix	3
10 mM Primer DENT 1	1,2
10 mM Primer DENT 2	1,2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
TaqDNA Polymerase	0,1
H <sub>2</sub> O	9
DNA template	10

**Tabella 4:** Mix di reazione/campione

Le sequenze dei primers utilizzati nella ricerca di *T. denticola* sono:

**DENT 1** : 5' TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T 3'

**DENT 2** : 5' TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA 3'

La reazione di amplificazione è stata eseguita all'interno del termociclatore, seguendo i cicli amplificazione riportati in Tabella 5:

	CICLI DI AMPLIFICAZIONE	
R i c e r c a	1) T = 95°C	3'
	2) T = 95°C	30''
	3) T = 60°C	1'
	4) T = 72°C	1'
	GO TO 2 REP 36	
d	5) T = 72°C	5'
	HOLD 4°C END	

**Tabella 5:** Cicli di amplificazione



Ricerca di *Porphyromonas gingivalis*

Per le reazioni di amplificazione viene preparata per ciascun campione, per un volume totale finale di 20  $\mu$ l, una mix di reazione contenente tutti i reagenti riportati in tabella 6 nelle rispettiva quantità e concentrazioni:

REAGENTI	QUANTITA' ( $\mu$ l)
10X Taq buffer	3
2mM dNTP mix	3
10 mM Primer DENT 1	1,5
10 mM Primer DENT 2	1,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,8
Taq DNA Polymerase	0,3
H <sub>2</sub> O	8,9
DNA template	10

Tabella 6: Mix di reazione/campione

Per la ricerca di *P. gingivalis* sono stati utilizzati i seguenti primers:

**PORF 2:** 5' AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG 3'

**PORF 4:** 5' CTG TTA GCA ACT ACC GAT GT 3'

Dopo aver preparato i campioni si avvia il programma di amplificazione all'interno del termociclatore, , come descritto in tabella 7:

CICLI DI AMPLIFICAZIONE	
1) T = 95°C	3'
2) T = 95°C	30''
3) T = 60°C	45''
4) T = 72°C	30''
GO TO 2 REP 35	
5) T = 72°C	5'
HOLD 4°C END	

Tabella 7: Cicli di amplificazione

Ricerca di *P. intermedia*

Per le reazioni di amplificazione viene preparata per ciascun campione, per un volume totale finale di 20  $\mu$ l, una mix di reazione contenente tutti i reagenti riportati in tabella 8 nelle rispettiva quantità e concentrazioni:

REAGENTI	QUANTITA' ( $\mu$ l)
10X Taq buffer	3
2mM dNTP mix	3
10 mM Primer DENT 1	1,5
10 mM Primer DENT 2	1,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,8
Taq DNA Polymerase	0,3
H <sub>2</sub> O	8,9
DNA template	10

**Tabella 8:** Mix di reazione/campione

Le sequenze amplicanti utilizzati nella ricerca di *P. intermedia* sono:

**PREV 2:** 5' CGT GGA CCA AAG ATT CAT CGG T 3'

**PREV 3:** 5' CTT TAC TCC CCA ACA AAA GCA 3'

Dopo aver preparato i campioni si avvia il programma di amplificazione all'interno del termociclatore, seguendo i cicli di amplificazione riportati in tabella 9:

CICLI DI AMPLIFICAZIONE	
1) T = 95°C	3'
2) T = 95°C	30''
3) T = 60°C	45''
4) T = 72°C	20''
GO TO 2 REP 35	
5) T = 72°C	5'
HOLD 4°C END	

**Tabella 9:** Cicli di amplificazione

Ricerca di *A. actinomycetemcomitans*

Per le reazioni di amplificazione viene preparata per ciascun campione, per un volume totale finale di 20  $\mu$ l, una mix di reazione contenente tutti i reagenti riportati in tabella 10 nelle rispettiva quantità e concentrazioni:

REAGENTI	QUANTITA' ( $\mu$ l)
10X Taq buffer	5
2mM dNTP mix	5
10 mM Primer DENT 1	0,5
10 mM Primer DENT 2	0,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	6
Taq DNA Polymerase	1
H <sub>2</sub> O	27
DNA template	10

**Tabella 10:** Mix di reazione/campione

I primers per la ricerca di *A. actinomycetemcomitans* utilizzati sono:

**PRIMER 1:** 5' TCG CGA ATC AGC TCG CCG 3'

**PRIMER 2:** 5' GCT TTG CAA GCT CCT CAC C 3'

Dopo aver preparato i campioni si avvia il programma di amplificazione all'interno del termociclatore, come descritto in tabella 10:

CICLI DI AMPLIFICAZIONE	
1) T = 95°C	3'
2) T = 95°C	30''
3) T = 65°C	60''
4) T = 72°C	60''
GO TO 2 REP 30	
5) T = 72°C	5'
HOLD 4°C END	

**Tabella 11:** Cicli di amplificazione

Ricerca di *T. forsythensis*

Per le reazioni di amplificazione viene preparata per ciascun campione, per un volume totale finale di 20  $\mu$ l, una mix di reazione contenente tutti i reagenti riportati in tabella 12 nelle rispettiva quantità e concentrazioni:

REAGENTI	QUANTITA' ( $\mu$ l)
10X Taq buffer	3
2mM dNTP mix	3
10 mM Primer DENT1	1,2
10 mM Primer DENT 2	1,2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,8
Taq DNA Polymerase	0,3
H <sub>2</sub> O	9,5
DNA template	10

**Tabella 12:** Mix di reazione/campione

Nella ricerca di *T. forsythensis* sono stati utilizzati i seguenti primers:

FOR 1 : 5' TAC AGG GGA ATA AAA TGA GAT ACG 3'

FOR 2 : 5' ACG TCA TCC CAA CCT TCC TC 3'

La reazione di amplificazione è stata eseguita all'interno del termociclatore, seguendo i cicli amplificazione riportati in tabella 13:

CICLI DI AMPLIFICAZIONE	
1) T = 95°C	3'
2) T = 95°C	30''
3) T = 65°C	45''
4) T = 72°C	40''
GO TO 2 REP 30	
5) T = 72°C	5'
HOLD 4°C END	

**Tabella 13:** Cicli di amplificazione

#### 4.4.3 ELETTROFORESI IN GEL D'AGAROSIO

Dopo l'amplificazione, 10µl di prodotto della PCR sono stati sottoposti a migrazione mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1%, per verificare la presenza del DNA 16S dei diversi batteri parodontopatogeni amplificati precedentemente.

Come standard per l'elettroforesi è stato utilizzato un marker di DNA (MassRuler Express DNA Ladder Mix, Riverse ready to use).

Nei singoli pozzetti sono stati caricati 10 µl di marker e 10 µl di amplicone.

Il gel è stato fatto correre per 10' a 75 Volt e successivamente a 100 Volt per 45' .

La presenza delle bande è stata evidenziata con il transilluminatore.

Questo è reso possibile dal legame dei frammenti del DNA con GEL RED presente nel gel di agarosio.

#### **4.5 ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI**

I risultati ottenuti dall'analisi microbiologica del Gruppo di studio 1 e del gruppo controllo sono stati analizzati utilizzando il test Chi-quadrato per tutti i patogeni ad eccezione di *T. denticola* e *P.gingivalis* per i quali, dato il numero minore di campioni positivi, è stato utilizzato il Test Esatto di Fisher.

Per l'analisi del Gruppo di studio 2 i test utilizzati sono stati: il Confronto tra Proporzioni ed il Test Esatto di Fisher.

## **Risultati**

## **Capitolo 5:**

### **RISULTATI**

#### **5.1 RISULTATI GRUPPO DI STUDIO 1**

I risultati relativi alla valutazione dello stato parodontale sono riportati in tabella 1:

Sito di prelievo	n	Profondità di sondaggio (mm)			Sanguinamento			Indice di placca			
		1	2	3	(-)	(+)	(++)	0	1	2	3
Molare	26	13	12	1	21	5	0	14	7	2	0
Incisivo centrale superiore	25	17	7	1	25	0	0	19	6	0	0
Incisivo centrale inferiore	26	15	10	1	23	3	0	17	8	1	0

**Tabella 1** : Stato parodontale del gruppo di studio 1

In Tabella 2 sono riportate le specie batteriche isolate dai pazienti del gruppo di studio 1 e il valore di pH salivare riscontrato.

#### **LEGENDA**

<b>SIMBOLO</b>	<b>DEFINIZIONE</b>
<b>NG</b>	<i>No growth</i>
<b>NP</b>	<i>No present</i>

Paziente	Campione salivare	Agar sangue	Chrom Agar	Agar Azide	pH
1	1	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
2	2	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
3	3	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
4	4	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
5	5	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
6	6	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
7	7	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
8	8	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
9	9	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
10	10	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
11	11	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
12	12	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
13	13	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
14	14	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
15	15	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
16	16	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
17	17	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
18	18	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
19	19	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
20	20	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
21	21	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
22	22	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
23	23	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
24	24	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
25	25	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7
26	26	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
27	27	<i>Strepto mitis/oralis</i>	NG	NP	7

**Tabella 2:** Specie batteriche isolate dal tampone salivare del gruppo di studio 1



I risultati ottenuti del test molecolare, effettuato su campioni prelevati ai pazienti costituenti il gruppo di studio 1 a livello di tre siti specifici:

- solco mesio-buccale del primo molare superiore permanente o secondo molare superiore deciduo, in assenza, dell' elemento permanente in posizione 6,
- solco vestibolare dell' incisivo centrale superiore permanente o, in assenza, deciduo,
- solco linguale dell' incisivo centrale inferiore permanente o, in assenza, deciduo, sono riportati in Tabella 3.

Paziente	Numero campione	Campione Parodontale	TEST MOLECOLARE				
			<i>A.a</i>	<i>T.d</i>	<i>P.i</i>	<i>T.f</i>	<i>P.g</i>
1	1	Solco L	+	-	+	+	-
2	2	Solco M-V	+	-	-	+	-
	3	Solco V	+	-	-	+	-
3	4	Solco M-V	+	-	-	+	-
	5	Solco V	+	-	-	+	-
	6	Solco L	+	-	-	+	-
4	7	Solco M-V	+	-	-	+	-
	8	Solco V	+	-	-	+	-
	9	Solco L	+	-	-	-	-
5	10	Solco M-V	+	-	-	+	-
	11	Solco V	+	-	+	-	-
	12	Solco L	-	-	-	-	-
6	13	Solco M-V	+	-	+	-	-
	14	Solco V	+	-	-	-	-
	15	Solco L	-	-	+	-	-
7	16	Solco M-V	+	-	-	+	-
	17	Solco V	+	-	-	+	-
	18	Solco L	+	-	+	-	-
8	19	Solco M-V	+	-	-	+	-
	20	Solco V	+	-	-	-	-
	21	Solco L	+	-	+	-	-
9	22	Solco M-V	+	-	-	-	-
	23	Solco V	+	+	-	+	+
	24	Solco L	+	+	-	+	+
10	25	Solco M-V	+	+	-	+	+
	26	Solco V	-	-	+	+	-
	27	Solco L	-	-	-	-	-
11	28	Solco M-V	-	-	-	-	-
	29	Solco V	+	-	+	-	-
	30	Solco L	-	-	-	+	-

12	31	Solco M-V	-	-	-	+	-
	32	Solco V	-	-	-	-	-
	33	Solco L	-	-	-	-	-
13	34	Solco M-V	+	-	+	+	-
	35	Solco V	+	-	-	+	-
	36	Solco L	+	-	-	+	-
14	37	Solco M-V	-	-	+	-	-
	38	Solco V	-	-	+	-	-
	39	Solco L	-	-	-	+	-
15	40	Solco M-V	+	-	-	-	-
	41	Solco V	+	-	-	-	-
	42	Solco L	+	-	-	-	-
16	43	Solco M-V	+	-	-	+	-
	44	Solco V	+	-	-	+	-
	45	Solco L	+	-	-	+	-
17	46	Solco M-V	+	-	-	-	-
	47	Solco V	+	-	-	+	-
	48	Solco L	-	-	+	-	-
18	49	Solco M-V	+	-	-	-	-
	50	Solco V	+	-	-	+	-
	51	Solco L	+	-	-	+	-
19	52	Solco M-V	+	-	-	+	-
	53	Solco V	+	-	-	+	-
	54	Solco L	+	-	-	+	-
20	55	Solco M-V	-	-	-	-	-
	56	Solco V	+	-	-	+	-
	57	Solco L	+	-	-	+	-
21	58	Solco M-V	-	-	-	-	-
	59	Solco V	-	-	-	-	-
	60	Solco L	-	-	-	-	-
22	61	Solco M-V	-	-	-	-	-
	62	Solco V	-	-	-	-	-
	63	Solco L	-	-	-	-	-
23	64	Solco M-V	-	-	-	-	-
	65	Solco V	+	-	-	+	-
	66	Solco L	-	-	-	-	-
24	67	Solco M-V	-	-	-	-	-
	68	Solco V	-	-	-	-	-
	69	Solco L	-	-	-	-	-
25	70	Solco M-V	+	-	+	+	-
	71	Solco V	-	-	-	-	-
	72	Solco L	+	-	-	+	-
26	73	Solco M-V	-	-	+	+	-
	74	Solco M-V	+	-	+	-	-
	75	Solco V	+	-	+	-	-
	76	Solco L	-	-	-	-	-
27	77	Solco L	-	-	+	-	-

**Tabella 3:** Campioni parodontali positivi in PCR (Gruppo di studio 1)

LEGENDA

SIMBOLO	DEFINIZIONE
<i>A.a.</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>P.g.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P.i.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>T.f.</i>	<i>Tannerella forsythensis</i>
<i>T.d.</i>	<i>Treponema denticola</i>
<b>Solco M-V</b>	Solco mesio-buccale primo molare superiore permanente o secondo molare superiore deciduo in assenza dell' elemento permanente in posizione 6.
<b>Solco V</b>	Solco vestibolare incisivo centrale superiore permanente o, in assenza, deciduo.
<b>Solco L</b>	Solco linguale incisivo centrale inferiore permanente o, in assenza deciduo.
+	POSITIVO
-	NEGATIVO

Il test molecolare, eseguito direttamente sull'estratto di DNA del campione di fluido crevicolare, ha consentito di valutare la presenza dei batteri parodontogeni: *Treponema denticola* in 3/77(3,90%) campioni, *Porphyromonas gingivalis* in 3/77 (3,90%) campioni, *Prevotella intermedia* in 17/77 (22,08%) campioni, *Tannerella forsythensis* in 37/77 (48,05%) campioni ed *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in 48/77 (62,34%) campioni.

5.1.1 RISULTATI GRUPPO CONTROLLO

I risultati relativi alla valutazione dello stato parodontale sono riportati in tabella 4.

Sito di prelievo	N	Profondità di sondaggio (mm)			Sanguinamento			Indice di placca			
		1	2	3	(-)	(+)	(++)	0	1	2	3
Molare	52	28	17	5	43	9	0	30	18	3	2
Incisivo centrale superiore	46	33	13	0	45	1	0	37	9	0	0
Incisivo centrale inferiore	46	29	14	3	41	5	0	34	10	1	1

**Tabella 4:** Stato parodontale del gruppo controllo

In Tabella 5 sono riportate le specie batteriche isolate dai pazienti del gruppo controllo ed i valori di pH salivare riscontrati.

<b>Paziente</b>	<b>Campione salivare</b>	<b>Agar Sangue</b>	<b>Chrom Agar</b>	<b>Agar Azide</b>	<b>pH</b>
1	1	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
2	2	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
3	3	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
4	4	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
5	5	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
6	6	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
7	7	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
8	8	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
9	9	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
10	10	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
11	11	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
12	12	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
13	13	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
14	14	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
15	15	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
16	16	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7

17	17	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
18	18	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
19	19	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
20	20	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
21	21	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
22	22	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
23	23	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
24	24	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
25	25	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
26	26	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7
27	27	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
28	28	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
29	29	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
30	30	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
31	31	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
32	32	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
33	33	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
34	34	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
35	35	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
36	36	Strepto	NG	NP	7

		sanguinis;mitis-oralis;mutans			
37	37	Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans	NG	NP	7
38	38	Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans	NG	NP	7
39	39	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
40	40	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
41	41	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
42	42	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
43	43	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
44	44	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
45	45	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;mutans</i>	NG	NP	7
46	46	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;</i>	NG	NP	7

**Tabella 5:** Specie batteriche isolate nel campiona salivare del gruppo controllo

**LEGENDA**

<b>SIMBOLO</b>	<b>DEFINIZIONE</b>
<b>NG</b>	<i>No growth</i>
<b>NP</b>	<i>No present</i>

I risultati ottenuti dal test molecolare, effettuato sui campioni parodontali prelevati ai pazienti costituenti il gruppo controllo a livello di tre siti specifici:

- ° solco mesio-buccale primo molare superiore permanente o secondo molare superiore deciduo in assenza dell' elemento permanente in posizione 6,
- ° solco vestibolare incisivo centrale superiore permanente o, in assenza, deciduo,
- ° solco linguale incisivo centrale inferiore permanente o, in assenza deciduo, sono riportati in Tabella 6.

Paziente	Numero campione	Campione parodontale	Test Molecolare				
			A.a	T.d	P.i	T.f	P.g
1	1	Solco M-V	-	-	-	-	+
	2	Solco V	-	-	-	-	+
	3	Solco L	-	-	-	-	-
2	4	Solco M-V	+	-	-	-	-
	5	Solco V	+	-	-	-	-
	6	Solco L	-	-	-	-	-
3	7	Solco M-V	-	-	+	-	-
	8	Solco V	-	-	-	-	-
	9	Solco L	-	-	-	-	-
4	10	Solco M-V	+	-	+	-	-
	11	Solco M-V	+	-	+	-	-
	12	Solco V	+	-	-	-	-
	13	Solco L	-	-	+	+	-
5	14	Solco M-V	+	-	+	+	-
	15	Solco M-V	-	-	-	-	-
	16	Solco V	-	-	-	-	-
	17	Solco L	-	-	-	-	-
6	18	Solco M-V	-	-	-	-	-
	19	Solco M-V	-	-	-	-	-
	20	Solco V	-	-	-	-	-
	21	Solco L	-	-	-	-	-
7	22	Solco M-V	-	-	+	-	-
	23	Solco M-V	-	-	-	-	-
	24	Solco V	-	-	+	-	-
	25	Solco L	-	-	-	-	-
8	26	Solco M-V	-	-	+	-	-
	27	Solco M-V	-	-	+	-	-
	28	Solco V	-	-	-	-	-
	29	Solco L	-	-	-	-	-
9	30	Solco M-V	+	-	-	-	-
	31	Solco M-V	+	-	-	-	-
	32	Solco V	+	-	-	-	-
	33	Solco L	-	-	-	-	-
10	34	Solco M-V	+	-	-	-	-
	35	Solco V	+	-	-	-	-
	36	Solco L	+	-	-	-	-
11	37	Solco M-V	-	-	-	-	-
	38	Solco V	-	-	-	-	-
	39	Solco L	-	-	-	-	-
12	40	Solco M-V	-	-	-	-	-
	41	Solco V	-	-	-	-	-
	42	Solco L	-	-	-	-	-
13	43	Solco M-V	-	-	-	-	-
	44	Solco V	+	-	-	-	-
	45	Solco L	+	-	-	-	-

14	46	Solco M-V	-	-	-	-	-
	47	Solco V	-	-	-	-	-
	48	Solco L	-	-	-	-	-
15	49	Solco M-V	-	-	-	-	-
	50	Solco V	-	-	-	-	-
	51	Solco L	+	-	-	+	-
16	52	Solco M-V	-	-	-	+	-
	53	Solco V	-	-	-	+	-
	54	Solco L	-	-	-	-	-
17	55	Solco M-V	+	-	-	-	-
	56	Solco V	-	-	-	-	-
	57	Solco L	+	-	-	-	-
18	58	Solco M-V	+	-	-	+	-
	59	Solco V	+	-	-	-	-
	60	Solco L	+	-	-	-	-
19	61	Solco M-V	-	-	-	-	-
	62	Solco V	-	-	-	-	-
	63	Solco L	-	-	-	-	-
20	64	Solco M-V	-	-	-	+	-
	65	Solco V	-	-	-	+	-
	66	Solco L	+	-	-	+	-
21	67	Solco M-V	+	-	+	-	-
	68	Solco V	-	-	+	-	-
	69	Solco L	-	-	-	-	-
22	79	Solco M-V	-	-	-	-	-
	71	Solco V	-	-	-	-	-
	72	Solco L	-	-	-	-	-
23	73	Solco M-V	-	-	-	+	-
	74	Solco V	-	-	-	+	-
	75	Solco L	-	-	-	+	-
24	76	Solco M-V	-	-	-	-	-
	77	Solco V	-	-	-	-	-
	78	Solco L	-	-	-	-	-
25	85	Solco M-V	-	-	-	-	-
	86	Solco V	-	-	-	-	-
	87	Solco L	-	-	-	-	-
26	88	Solco M-V	-	-	-	-	-
	89	Solco V	-	-	-	-	-
	90	Solco L	-	-	-	-	-
27	91	Solco M-V	-	-	-	-	-
	92	Solco V	-	-	-	-	-
	93	Solco L	-	-	-	-	-
28	94	Solco M-V	-	-	-	-	-
	95	Solco V	+	-	+	-	-
	96	Solco L	-	-	+	-	-
29	97	Solco M-V	-	-	+	-	-
	98	Solco V	-	-	+	-	-
	99	Solco L	-	-	+	-	-
30	100	Solco M-V	-	-	+	-	-



	102	Solco L	-	-	-	-	-
31	103	Solco M-V	+	-	-	-	-
	104	Solco V	+	-	-	-	-
	105	Solco L	+	-	-	-	-
32	106	Solco M-V	-	-	-	-	-
	107	Solco V	-	-	-	-	-
	108	Solco L	-	-	-	-	-
33	109	Solco M-V	-	-	-	-	-
	110	Solco V	+	-	+	-	-
	111	Solco L	-	-	-	-	-
34	112	Solco M-V	-	-	-	-	-
	113	Solco V	-	-	-	-	-
	114	Solco L	+	-	+	-	-
35	115	Solco M-V	-	-	+	-	-
	116	Solco V	-	-	-	-	-
	117	Solco L	-	-	+	-	-
36	118	Solco M-V	-	-	-	-	-
	119	Solco V	+	-	+	+	-
	120	Solco L	-	-	-	+	-
37	121	Solco M-V	-	-	-	-	-
	122	Solco V	-	-	-	-	-
	123	Solco L	-	-	-	-	-
38	124	Solco M-V	-	-	-	-	-
	125	Solco V	-	-	-	+	-
	126	Solco L	-	-	-	-	-
39	127	Solco M-V	+	-	-	-	-
	128	Solco V	-	-	-	-	-
	129	Solco L	+	-	+	-	-
40	130	Solco M-V	-	-	-	-	-
	131	Solco V	-	-	+	+	-
	132	Solco L	-	-	-	-	-
41	133	Solco M-V	-	-	-	-	-
	134	Solco V	+	-	+	-	-
	135	Solco L	+	-	+	-	-
42	136	Solco M-V	-	-	-	-	-
	137	Solco V	-	-	-	-	-
	138	Solco L	+	-	-	-	-
43	139	Solco M-V	-	-	-	-	-
	140	Solco V	-	-	-	-	-
	141	Solco L	-	-	-	-	-
44	142	Solco M-V	-	-	-	-	-
	143	Solco V	-	-	-	-	-
	144	Solco L	-	-	-	-	-
45	145	Solco M-V	-	-	-	-	-
	146	Solco V	-	-	-	-	-
	147	Solco L	-	-	-	-	-
46	148	Solco M-V	-	-	-	-	-
	149	Solco V	-	-	-	-	-

**Tabella 6:** Campioni parodontali positivi in PCR (Gruppo controllo)

**LEGENDA**

<b>SIMBOLO</b>	<b>DEFINIZIONE</b>
<b>A.a.</b>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<b>P.g.</b>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<b>P.i.</b>	<i>Prevotella intermedia</i>
<b>T.f.</b>	<i>Tannerella forsythensis</i>
<b>T.d.</b>	<i>Treponema denticola</i>
<b>Solco M-V</b>	Solco mesio-buccale primo molare superiore permanente o secondo molare superiore deciduo in assenza dell' elemento permanente in posizione 6.
<b>Solco V</b>	Solco vestibolare incisivo centrale superiore permanente o, in assenza, deciduo.
<b>Solco L</b>	Solco linguale incisivo centrale inferiore permanente o, in assenza deciduo.
<b>+</b>	POSITIVO
<b>-</b>	NEGATIVO

I risultati del test molecolare, eseguito sui campioni di fluido crevicolare dei pazienti del gruppo controllo ha consentito di valutare la presenza dei 5 principali batteri parodontogeni: *Treponema denticola* in 0/150(0%) campioni, *Porphyromonas gingivalis* in 2/150 (1,33%) campioni, *Prevotella intermedia* in 28/150 (18,67%) campioni, *Tannerella forsythensis* in 17/150 (11,33%) campioni ed *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in 33/150 (22%) campioni.

**5.1.2 ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI**

In Tabella 7 sono indicati il numero e la percentuale dei campioni positivi e negativi, riscontrati nel gruppo di studio in seguito all'analisi molecolare. I dati sono stati suddivisi in base al sito di prelievo ed al patogeno ricercato.

BATTERIO	SITO	n. tot	n. positivi	% positivi	n. negativi	% negativi
<i>T. denticola</i>	molare	26	1	3,85%	25	96,15%
	incisivo superiore	25	1	4%	24	96%
	incisivo inferiore	26	1	3,85%	25	96,15%
<i>P. gingivalis</i>	molare	26	1	3,85%	25	96,15%
	incisivo superiore	25	1	4%	24	96%
	incisivo inferiore	26	1	3,85%	25	96,15%
<i>P.intermedia</i>	molare	26	6	23,08%	20	76,2%
	incisivo superiore	25	5	20%	20	80%
	incisivo inferiore	26	6	23,08%	20	76,2%
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	molare	26	17	65,38%	9	34,62%
	incisivo superiore	25	18	72%	7	28%
	incisivo inferiore	26	13	50%	13	50%
<i>T. forsythia</i>	molare	26	13	50%	13	50%
	incisivo superiore	25	13	52%	12	48%
	incisivo inferiore	26	11	42,31%	15	57,69%

**Tabella 7:** Analisi descrittiva risultati gruppo campione per l'indagine molecolare

In Tabella 8 sono indicati il numero e la percentuale dei campioni positivi e negativi, riscontrati nel gruppo controllo. I dati per essere analizzati sono stati suddivisi in base al sito di prelievo ed al patogeno ricercato.

BATTERIO	SITO	n. tot	n. positivi	% positivi	n. negativi	% negativi
<i>T. denticola</i>	molare	52	0	0%	52	100%
	incisivo superiore	46	0	0%	46	100%
	incisivo inferiore	46	0	0%	46	100%
<i>P. gingivalis</i>	molare	52	1	1,92%	51	98,08%
	incisivo superiore	46	1	2,17%	45	97,83%
	incisivo inferiore	46	0	0%	46	100%
<i>P.intermedia</i>	molare	52	10	19,23%	42	80,77%
	incisivo superiore	46	10	21,74%	36	78,26%
	incisivo inferiore	46	8	17,39%	38	82,61%
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	molare	52	11	21,15%	41	78,85%
	incisivo superiore	46	11	23,40%	35	76,60%
	incisivo inferiore	46	11	23,40%	35	76,60%
<i>T. forsythia</i>	molare	52	5	9,62%	47	90,38%
	incisivo superiore	46	6	13,04%	40	86,96%
	incisivo inferiore	46	6	12,77%	40	87,23%

**Tabella 8:** Analisi descrittiva risultati gruppo controllo per l'indagine molecolare

Dall'analisi Chi-quadrato, effettuata per ogni patogeno e distinta per ciascun sito, mettendo a confronto i valori ottenuti per il gruppo di studio ed il gruppo controllo, emergono valori di p significativi rispettivamente per *T. forsythensis* ed *A.actinomycetemcomitans* come indicato nelle tabelle seguenti. I due patogeni, *T.denticola* e *P.gingivalis*, analizzati mediante Test Esatto di Fisher non hanno dato risultati positivi in termini di significatività.

**P.gingivalis**

MOLARE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	1 (3,85%)	25 (96,15%)	26
GRUPPO CONTROLLO	1 (1,92%)	51 (98,08%)	52

Test Esatto di Fisher; p= 1.000

INCISIVO SUPERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	1 (4%)	24 (96%)	25
GRUPPO CONTROLLO	1 (2,17%)	45 (97,83%)	46

Test Esatto di Fisher ; p= 1.000

INCISIVO INFERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	1 (3,85%)	25 (96,15%)	26
GRUPPO CONTROLLO	0 (0%)	46 (100%)	46

Test Esatto di Fisher; p= 0.361

**T. denticola**

MOLARE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	1 (3,85%)	25 (96,15%)	26
GRUPPO CONTROLLO	0 (0%)	52 (100%)	52

Test Esatto di Fisher; p= 0.333

INCISIVO SUPERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	1 (4%)	24 (96%)	25
GRUPPO CONTROLLO	0 (0%)	46 (100%)	46

Test Esatto di Fisher; p= 0.352

INCISIVO INFERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	1 (3,85%)	25 (96,15%)	26
GRUPPO CONTROLLO	0 (0%)	46 (100%)	46

Test Esatto di Fisher;  $p= 0.361$

**P.intermedia**

MOLARE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	6 (23,08%)	20 (76,92%)	26
GRUPPO CONTROLLO	10 (19,23%)	42 (80,77%)	52

Chi- quadrato = 0.010 con 1 grado di libertà;  $p= 0.921$

INCISIVO SUPERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	5 (20%)	20 (80%)	25
GRUPPO CONTROLLO	10 (21,74%)	36 (78,26%)	46

Chi- quadrato = 0.018 con 1 grado di libertà;  $p= 0.894$

INCISIVO INFERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	6 (23,08%)	20 (76,92%)	26
GRUPPO CONTROLLO	8 (17,39%)	38 (82,610%)	46

Chi- quadrato = 0.076 con 1 grado di libertà;  $p= 0.783$

**T. forsythia**

MOLARE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	13 (50%)	13 (50%)	26
GRUPPO CONTROLLO	5 (9,62%)	47 (90,38%)	52

Chi- quadrato = 13.731 con 1 grado di libertà; p= 0.000

INCISIVO SUPERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	13 (52%)	12 (48%)	25
GRUPPO CONTROLLO	6 (13,04%)	40 (86,96%)	46

Chi- quadrato = 10.633 con 1 grado di libertà; p= 0.001

INCISIVO INFERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	11 (42,31%)	15 (57,69%)	26
GRUPPO CONTROLLO	6 (12,77%)	40 (87,23%)	46

Chi- quadrato = 6.348 con 1 grado di libertà; p= 0.012

**A. actinomycetemcomitans**

MOLARE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	17 (65,38%)	9 (34,62%)	26
GRUPPO CONTROLLO	11 (21,15%)	41 (78,85%)	52

Chi- quadrato = 12.877 con 1 grado di libertà; p= 0.000

INCISIVO SUPERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	18 (72%)	7 (28%)	25
GRUPPO CONTROLLO	11 (23,40%)	35 (76,60%)	46

Chi- quadrato = 13.575 con 1 grado di libertà; p= 0.000

INCISIVO INFERIORE	POSITIVO	NEGATIVO	TOT CAMPIONI
GRUPPO DI STUDIO	13 (50%)	13 (50%)	26
GRUPPO CONTROLLO	11 (23,40%)	35 (76,60%)	46

Chi- quadrato = 3.981 con 1 grado di libertà; p= 0.046

## 5.2 RISULTATI GRUPPO DI STUDIO 2

Tutti i pazienti testati presentavano al momento del prelievo un buono stato di salute orale, ed erano tutti soggetti a trattamento ortopedico-ortodontico.

In Tabella 9 sono riportate le specie batteriche isolate dai pazienti del gruppo di studio 2 e il valore di pH salivare riscontrato.

Paziente	Campione salivare	Agar Azide	Chrom Agar	Agar Sangue	pH
1	1	<i>Strepto pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>	AC	7
2	2	<i>Strepto thoralensis</i>	NG	AC	7
3	3	NG	NG	AC	7
4	4	<i>Strepto pneum ; sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
5	5	NG	<i>C.albicans</i>	AC	7
6	6	NG	<i>C. albicans</i>	AC	7
7	7	insuff	NG	AC	7
8	8	<i>Strepto mitis-oralis</i>	NG	AC	7
9	9	<i>Strepto mitis-oralis</i>	<i>C.albicans</i>	AC	7
10	10	<i>Strepto mitis-oralis</i>	NG	AC	7
11	11	<i>Strepto mitis-oralis</i>	NG	AC	7
12	12	<i>Strepto mitis</i>	NG	AC	7
13	13	<i>Strepto pneumo; sanguinis;mitis-oralis</i>	<i>C.cruzei</i>	AC	7
14	14	<i>Strepto salivarius</i>	<i>C.albicans-C.tropicalis</i>	AC	7
15	15	<i>Strepto sanguinis;mitis-oralis;salivarius</i>	NG	AC	7
16	16	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	insuff	7
17	17	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7

**Tabella 9:** Specie batteriche isolate nel campione salivare del Gruppo di studio 2



In Tabella 10 sono riportate le specie batteriche isolate dai pazienti del gruppo controllo ed il valore di pH salivare riscontrato.

Paziente	Campione salivare	Agar Azide	Chrom Agar	Agar Sangue	pH
1	1	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
2	2	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
3	3	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
4	4	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
5	5	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
6	6	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
7	7	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
8	8	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
9	9	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
10	10	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
11	11	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
12	12	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
13	13	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
14	14	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
15	15	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
16	16	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
17	17	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
18	18	<i>Strepto sanguinis;mitis-</i>	NG	AC	7
19	19	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
20	20	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
21	21	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
22	22	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
23	23	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
24	24	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
25	25	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
26	26	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
27	27	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
28	28	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
29	29	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
30	30	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
31	31	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
32	32	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
33	33	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
34	34	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
35	35	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
36	36	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
37	37	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
38	38	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7

39	39	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
40	40	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
41	41	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
42	42	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
43	43	<i>Streptosanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
44	44	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
45	45	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7
46	46	<i>Strepto sanguinis;mitis</i>	NG	AC	7

### **LEGENDA**

<b>SIMBOLO</b>	<b>DEFINIZIONE</b>
<b>NG</b>	<i>No growth</i>
<b>AC</b>	<i>Altra crescita</i>

I risultati dell'esame colturale, eseguito sui campioni salivari del Gruppo di studio 2 mostrano come 3/17 pazienti (17,6%) sono risultati positivi per *Strptococcus pneumoniae* e 7/17 (41,2%) hanno mostrato positività per il genere *Candida*, a differenza dei pazienti appartenenti al gruppo controllo, il cui esame colturale non ha mostrato la presenza di microrganismi patogeni.

Al fine di valutare se la presenza di flora patogena in ciascun campione fosse in qualche modo correlata alla presenza della protesi nel cavo orale ed all'igiene orale del paziente è stata valutata la presenza di microrganismi sulle superfici sopra e sub palatali della protesi stessa.

La Tabella 11 riporta le specie batteriche identificate:

<b>Pz</b>	<b>Campione protesi</b>	<b>Igiene orale</b>	<b>Agar Azide</b>	<b>Chrom Agar</b>	<b>Agar Sangue</b>	<b>Sopra/ Sotto</b>	<b>pH</b>
1	1	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i>	AC	sotto	7
2	2	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i>	AC	sotto	7
3	3	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i> <i>C.albicans</i>	AC	sotto	7
4	4	2 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7

			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i>	AC	sotto	7
5	5	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i>	AC	sotto	7
6	6	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sotto	7
7	7	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i>	AC	sotto	7
8	8	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sotto	7
9	9	2 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sotto	7
10	10	2 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sotto	7
11	11	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sotto	7
12	12	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sotto	7
13	13	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sotto	7
14	14	2 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i>	AC	sotto	7
15	15	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.cruzei</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.cruzei</i>	AC	sotto	7
16	16	2 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	NG	AC	sotto	7
17	17	1 v/die	<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i>	AC	sopra	7
			<i>Strepto sanguinis</i>	<i>C.tropicalis</i>	AC	sotto	7

Tabella 11: Specie batteriche isolate dal colturale su protesi sopra e sub palatali.

5.2.1 ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI

<b><i>Colturale salivare Totale</i></b>		
Gruppo studio	17	p= 0,705
Gruppo controllo	46	p= 0

La differenza è: 0.705

Errore standard della differenza: 0.1114

Intervallo di confidenza della differenza al 95%: 0.4867 -0.9233

$z = 5.967$ ;  $P = 0.000$

<b><i>Colturale saliva S. pneumoniae</i></b>		
Gruppo studio	17	p= 0,176
Gruppo controllo	46	p= 0

La differenza è: 0.176

Errore standard della differenza: 0.06037

Intervallo di confidenza della differenza al 95%: 0.05768 -0.2943

$z = 2.248$ ;  $P = 0.025$

<b><i>Colturale salivare Candida</i></b>		
Gruppo studio	17	p= 0,411
Gruppo controllo	46	p= 0

La differenza è: 0.411

Errore standard della differenza: 0.08913

Intervallo di confidenza della differenza al 95%: 0.2363 -0.5857

$z = 4.159$ ;  $P = 0.000$

<b><i>Colturale salivare Protesi</i></b>		
Sopra	17	p= 0,47
Sotto	17	p= 0,705

La differenza è: -0.235

Errore standard della differenza: 0.1689

Intervallo di confidenza della differenza al 95%: -0.5659 -0.09594

$z = 1.043$ ;  $P = 0.297$

<i>Candida</i>	Spazzolatura No	Spazzolatura Si	
<b>1 v/die</b>	6	6	<b>12</b>
<b>2 v/die</b>	4	1	<b>5</b>
	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>17</b>

Test Esatto di Fisher:  $p = 0.297$

<i>S.pneumoniae</i>	Spazzolatura No	Spazzolatura Si	
<b>1 v/die</b>	9	3	<b>12</b>
<b>2 v/die</b>	4	1	<b>5</b>
	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>17</b>

Test Esatto di Fisher:  $p = 1,000$

### 5.3 CONCLUSIONI

#### 5.3.1 SINDROME DI DOWN

I soggetti affetti da disabilità fisiche e/o psichiche presentano, rispetto alla popolazione con anamnesi medica negativa, un rischio di sviluppare patologie del cavo orale maggiore.

In particolare, i pazienti affetti da Sindrome di Down presentano la capacità di ammalarsi di carie più basso rispetto ai controlli sani, di pari età. Quanto detto potrebbe essere messo in relazione con la particolare conformazione anatomica degli elementi dentari di questi pazienti (fessure occlusali poco profonde e microdonzia, responsabile della formazione di diastemi), alla conta di *Streptococcus mutans* particolarmente bassa e al pH salivare neutro.

E' tuttavia importante sottolineare come l'incidenza della carie nel soggetto con SD non debba mai essere trascurata, in particolare in relazione alle sue complicanze, potenzialmente responsabili di endocardite batterica in caso di cardiopatia congenita ed alle problematiche comportamentali, che possono rendere difficili le cure.

I soggetti affetti da SD a livello parodontale mostrano con elevata frequenza quadri clinici di gengivite marginale, gengiviti necrotizzanti acute e subacute, recessioni gengivali, perdita di osso verticale e orizzontale con formazione di tasche parodontali.

Nell'insorgenza e progressione della malattia parodontale sembrano svolgere un ruolo significativo batteri quali *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*.

La frequenza significativamente più elevata di *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythensis* in età precoce, riscontrata nel presente studio, sembra giustificare la maggiore predisposizione dei bambini affetti da SD nei confronti di patologie parodontali, quali gengivite e parodontite giovanile, rispetto ai soggetti sani.

L'associazione tra la presenza di *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythensis* e l'elevata predisposizione dei pazienti affetti da SD nei confronti delle patologie parodontali, pone l'accento sull'esigenza di far seguire all'identificazione delle diverse specie a livello delle tasche parodontali un antibiogramma, al fine di garantire una terapia antibiotica il più possibile mirata e specifica.

Fondamentale in questi pazienti rimane comunque il controllo dell'igiene orale già nella prima infanzia, al fine di prevenire l'insorgere di problematiche parodontali e favorire una maggiore qualità di vita al bambino.

Alla luce dei risultati ottenuti e delle conoscenze cliniche relative al paziente affetto da SD sarebbe interessante studiare il rapporto tra la composizione polimicrobica della bocca e la respirazione orale al fine di valutare se quest'ultima influisca sulla colonizzazione del cavo orale da parte dei 5 principali microrganismi parodontopatogeni. Sarebbe inoltre interessante studiare la prevalenza degli stessi microrganismi parodontopatogeni in un gruppo campione di età superiore ai 16 anni, per confrontare i risultati con quelli del presente studio, al fine di valutare l'influenza dell'età sulla composizione microbica orale.

### 5.3.2 DISPLASIA ECTODERMICA

Il trattamento orale dei soggetti con Displasia Ectodermica si basa sull'utilizzo di impianti dentali, capaci di dare un outcome clinico ottimale per il paziente.

Diversi studi sullo stato di salute orale di questi bambini e adolescenti suggeriscono una forte associazione tra ipodonzia e difetti dello smalto, ed anche come una maggiore igiene riduca il rischio di sviluppare carie dentale.

Nello studio condotto, i pazienti affetti da EDs hanno mostrato una maggiore predisposizione alla colonizzazione da parte di *Streptococcus pneumoniae* e di *Candida* a livello del cavo orale, rispetto ai controlli sani.

La presenza di un germe come *S. pneumoniae* a livello del cavo orale potrebbe essere messa in relazione con l'aumentata suscettibilità di questi pazienti a sviluppare patologie respiratorie; meno trascurabile è invece la presenza di *Candida*, soprattutto se si rapporta questo dato alla immunocompromissione del soggetto, alla particolare dieta che questi pazienti sono costretti a seguire ed al livello di igiene orale personale.

La mucosa orale di questi pazienti appare spesso secca e povera di ghiandole mucose labiali e buccali. Ricontro non raro a livello periorale è, infatti, la presenza di lesioni agli angoli della bocca provocate sia dal ristagno di saliva legato alla mancanza di una corretta dimensione verticale sia alla presenza di patogeni opportunisti all'interno del cavo orale.

L'igiene orale è perciò fondamentale, sia per la prevenzione della candidosi che per la risoluzione delle lesioni. I residui di cibo e medicine che si depositano sui tessuti del cavo orale e sui denti devono essere prontamente rimossi, perché possono predisporre alla malattia o aggravarla.

In quest'ottica è fondamentale un approccio multidisciplinare che preveda una promozione di corretti stili di salute orale ed alimentare nel bambino ad opera non solo dell'odontoiatra e dell'igienista dentale, ma anche di tutte le figure professionali, quali il pediatra di libera scelta, in grado di stimolare e sensibilizzare la famiglia a stili di salute orale e sulla necessità di controlli professionali periodici.



**BIBLIOGRAFIA CAP. 1**

- 1) **Alcan T, Basa S, Kargül B.** “Growth analysis of a patient with ectodermal dysplasia treated with endosseus implants: 6-years follow-up”. *J Oral Rehabil.* **2006** Mar;33(3):175-82.
- 2) **Akhyani M, Kiavash K.** “Ectodermal dysplasia with alopecia, onychodysplasia, hypohidrosis, keratoderma, abnormal teeth and deafness”. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* **2007** Nov-Dec;73(6):409-11.
- 3) **Arnold ML, Rauskolb R, Anton-Lamprecht I, Schinzel A, Schmid W.** “Prenatal diagnosis of anhidrotic ectodermal dysplasia.”. *Prenat Diagn.* **1984** Mar-Apr;4(2):85-98.
- 4) **Atasu M, Biren S.** “Ellis-van Creveld syndrome: dental, clinical, genetic and dermatoglyphic findings of a case”. *J Clin Pediatr Dent.* **2000** Winter;24(2):141-5.
- 5) **Bal C, Bal BT, Tüfekçiöglü D.** “Treatment considerations for a patient with hypohidrotic ectodermal dysplasia: a case report”.
- 6) **Baskan Z, Yavuz I, Ulku R, Kaya S, Yavuz Y, Basaran G, et al.** “Evaluation of ectodermal dysplasia”. *Kaohsiung J Med Sci.* **2006** Apr; 22(4):171-6.
- 7) **Bergendal B, Norderyd J, Bågesund M, Holst A.** “Signs and symptoms from ectodermal organs in young Swedish individuals with oligodontia”. *Int J Paediatr Dent.* **2006** Sep;16(5):320-6.
- 8) **Bessler M, Wilson DB, Mason PJ.** “Dyskeratosis congenita and telomerase”. *Curr Opin Pediatr.* **2004** Feb;16(1):23-8. Review.
- 9) **Booth B.** “Health--how do we get out of the mess?”. *N Z Med J.* **1989** Jun 14;102(869):297.
- 10) **Carrol ED, Gennery AR, Flood TJ, Spickett GP, Abinun M.** “Anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency: the role of NEMO”. *Arch Dis Child.* **2003** Apr;88(4):340-1.
- 11) **Cawood JI, Howell RA.** “Reconstructive preprosthetic surgery. I. Anatomical considerations”. *Int J Oral Maxillofac Surg.* **1991** Apr;20(2):75-82. Review.

- 12) **Chen Y, Molloy SS, Thomas L, Gambee J, Bächinger HP, Ferguson B**, et al. "Mutation within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** Jun 19;98(13):7218-23.
- 13) **Clarke A**. "Hypohidrotic ectodermal dysplasia". *J Med Genet*. **1987** Nov;24(11):659-63. Review.
- 14) **Clauss F, Manière MC, Obry F, Waltmann E, Hadj-Rabia S, Bodemer C**, et al. "Dento-craniofacial phenotypes and underlying molecular mechanisms in hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED): a review". *J Dent Res*. **2008** Dec;87(12):1089-99.
- 15) **Courtois G**. "The NF-kappaB signaling pathway in human genetic diseases". *Cell Mol Life Sci*. **2005** Aug;62(15):1682-91. Review.
- 16) **Crawford PJ, Aldred MJ, Clarke A**. "Clinical and radiographic dental findings in X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia". *J Med Genet*. **1991** Mar;28(3):181-5.
- 17) **Crump IA, Danks DM**. "Hypohidrotic ectodermal dysplasia. A study of sweat pores in the X-linked form and in a family with probable autosomal recessive inheritance". *J Pediatr*. **1971** Mar;78(3):466-73.
- 18) **Cui CY, Durmowicz M, Ottolenghi C, Hashimoto T, Griggs B, Srivastava AK**, et al. "Inducible mEDA-A1 transgene mediates sebaceous gland hyperplasia and differential formation of two types of mouse hair follicles". *Hum Mol Genet*. **2003** Nov 15;12(22):2931-40.
- 19) **Cui CY, Smith JA, Schlessinger D, Chan CC**. "X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia disruption yields a mouse model for ocular surface disease and resultant blindness". *Am J Pathol*. **2005** Jul;167(1):89-95.
- 20) **Cui CY, Hashimoto T, Grivennikov SI, Piao Y, Nedospasov SA, Schlessinger D**. "Ectodysplan regulates the lymphotoxin-beta pathway for hair differentiation". *Proc Natl Acad Sci USA*. **2006** Jun 13;103(24):9142-7.
- 21) **Cui CY, Schlessinger D**. "EDA signaling and skin appendage development". *Cell Cycle*. **2006** Nov 1;5(21):2477-83. Review.

- 22) **Cui CY, Kunisada M, Esibizione D, Douglass EG, Schlessinger D.** “Analysis of the temporal requirement for eda in hair and sweat gland development”. *J Invest Dermatol.* **2009** Apr;129(4):984-93.
- 23) **Darwin C.** The variations of animals and plants under domestications. Ed.2 London. John Murray 1875; pag 319.
- 24) **Dibbets JM.** “Mandibular rotation and enlargement”. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* **1990** Jul;98(1):29-32.
- 25) **Drögemüller C, Distl O, Leeb T.** “X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (ED1) in men, mice, and cattle”. *Genet Sel Evol.* **2003**;35 Suppl 1:S137-45. Review.
- 26) **Ersoy-Evans S, Erkin G, Fassihi H, Chan I, Paller AS, Sürücü S, et al.** “Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome resulting from a new homozygous mutation, 888delC, in the desmosomal protein plakophilin 1”. *J Am Acad Dermatol.* **2006** Jul;55(1):157-61.
- 27) **Ezer S, Bayés M, Elomaa O, Schlessinger D, Kere J.** “Ectodyspasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells”. *Hum Mol Genet.* **1999** Oct;8(11):2079-86.
- 28) **Farrington FH.** “The team approach to the management of ectodermal dysplasias”. *Birth Defects Orig Artic Ser.* **1988**;24(2):237-42.
- 29) **Fessing MY, Sharova TY, Sharov AA, Atoyán R, Botchkarev VA.** “Involvement of the Edar signaling in the control of hair follicle involution (catagen)”. *Am J Pathol.* **2006** Dec;169(6):2075-84.
- 30) **Freire-Maia N, Pinheiro M.** “Ectodermal dysplasias: a clinical and genetical study”. New York: Alan R Liss. **1984**
- 31) **Freire-Maia N, Lisboa-Costa T, Pagnan NA.** “Ectodermal dysplasias: how many?”. *Am J Med Genet.* **2001** Nov 15;104(1):84.
- 32) **Gardel P, Leyder P, Molhant G.** “Christ-Siemens-Touraine syndrome. Completed management is unrelated to the number of years”. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* **1985**;86(2):114-6.
- 33) **Ghosh S, Karin M.** “Missing pieces in NF-kappaB puzzle”. *Cell.* **2002** Apr;109 Suppl:S81-96.
- 34)

- 35) **Giannetti L, Rapelli G, Consolo U.** “Tooth disorders in ectodermal dysplasias”. *Minerva Stomatol.* **2003** Apr;52(4):181-5.
- 36) **Güler N, Cildir S, Iseri U, Sandalli N, Dilek O.** “Hypohidrotic ectodermal dysplasia with bilateral impacted teeth at the coronoid process: a case rehabilitated with mini dental implants”. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2005** May;99(5):E34-8.
- 37) **Hashimoto T, Schlessinger D, Cui CY.** “Troy binding to lymphotoxin-alpha activates NF kappa B mediated transcription”. *Cell Cycle.* **2008** Jan 1;7(1):106-11.
- 38) **Hertz JM, Nørgaard Hansen K, Juncker I, Kjeldsen M, Gregersen N.** “ A novel missense mutation (402C→T) in exon 1 in EDA gene in a family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia”. *Clin Genet.* **1998** Mar;53(3):205-9.
- 39) **Hickey AJ, Vergo TJ Jr.** “ Prosthetic treatments for patients with ectodermal dysplasia”. *J Prosthet Dent.* **2001** Oct;86(4):364-8.
- 40) **Hickey AJ, Salter M.** “Prosthodontic and psychological factors in treating patients with congenital and craniofacial defects”. *J Prosthet Dent.* **2006** May;95(5):392-6.
- 41) **Hobkirk JA, Nohl F, Bergendal B, Storhaug K, Richter MK.** “The management of ectodermal dysplasia and severe hypodontia. International conference statements”. *J Oral Rehabil.* **2006** Sep;33(9):634-7.
- 42) **Imirzalioglu P, Uckan S, Haydar SG.** “Surgical and prosthodontic treatment alternatives for children and adolescents with ectodermal dysplasia: a clinical report”. *J Prosthet Dent.* **2002** Dec;88(6):569-72.
- 43) **Itin PH, Fistarol SK.** “Ectodermal dysplasias”. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* **2004** Nov 15;131C(1):45-51. Review.
- 44) **Kere J, Srivastava AK, Montonen O, Zonana J, Thomas N, Ferguson B, et al.** “X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein”. *Nat Genet.* **1996** Aug;13(4):409-16

- 45) **Kobiela A, Kobiela K, Biedziak B, Trzeciak WH.** “A novel mutation A127G of the EDA-1 gene causing Tyr343Cys substitution in ectodysplasin-A in a family with anhidrotic ectodermal dysplasia”. *Acta Biochim Pol.* **2003**;50(1):255-8.
- 46) **Kupietzky A, Houpt M.** “Hypohidrotic ectodermal dysplasia: characteristics and treatment”. *Quintessence Int.* **1995** Apr; 26(4):285-91.
- 47) **Lamartine J, Munhoz Essenfelder G, Kibar Z, Lanneluc I, Callouet E, Laoudj D, et al.** “Mutations in GJB6 cause hidrotic ectodermal dysplasia”. *Nat Genet.* **2000** Oct;26(2):142-4.
- 48) **Lamartine J.** “Towards a new classification of ectodermal dysplasias”. *Clin Exp Dermatol.* **2003** Jul;28(4):351-5.
- 49) **Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, Stirrups DR.** “Hypodontia--a retrospective review of prevalence and etiology. Part I”. *Quintessence Int.* **2005** Apr;36(4):263-70. Review.
- 50) **Lexner MO, Bardow A, Hertz JM, Nielsen LA, Kreiborg S.** “Anomalies of tooth formation in hypohidrotic ectodermal dysplasia”. *Int J Paediatr Dent.* **2007** Jan;17(1):10-8.
- 51) **Locker D, Clarke M, Murray H.** “Oral health status of Canadian-born and immigrant adolescents in North York, Ontario”. *Community Dent Oral Epidemiol.* **1998** Jun;26(3):177-81.
- 52) **Lo Muzio L, Bucci P, Carile F, Riccitiello F, Scotti C, Coccia E, et al.** “Prosthetic rehabilitation of a child affected from anhidrotic ectodermal dysplasia: a case report”. *J Contemp Dent Pract.* **2005** Aug 15;6(3):120-6.
- 53) **Masse JF, Pérusse R.** “Ectodermal dysplasia”. *Arch Dis Child.* **1994** Jul;71(1):1-2.
- 54) **McGrath JA, McMillan JR, Shemanko CS, Runswick SK, Leigh IM, Lane EB, et al.** “Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome”. *Nat Genet.* **1997** Oct;17(2):240-4.
- 55) **Mena CA.** “Taurodontism”. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **1971** Nov;32(5):812-23.

- 56) **Mikkola ML, Thesleff I.** “ Ectodysplasin signaling in development”. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003** Jun-Aug;14(3-4):211-24.
- 57) **Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeek PA, Zonana J.** “Mutation in the human homologue dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia”. *Nat Genet.* **1999** Aug;22(4):366-9.
- 58) **Naito A, Yoshida H, Nishioka E, Satoh M, Azuma S, Yamamoto T, et al.** “TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal displasia”. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2002** Jun 25;99(13):8766-71.
- 59) **Nordgarden H, Jensen JL, Storhaug K.** “ Oligodontia is associated with extra-oral ectodermal symptoms and low whole salivary flow rates”. *Oral Dis.* **2001** Jul;7(4):226-32.
- 60) **Nowak AJ.** “Dental treatment for patients with ectodermal dysplasia”. *Birth Defects Orig Artic Ser.* **1988**;24(2):243-52.
- 61) **Nunn JH, Carter NE, Gillgrass TJ, Hobson RS, Jepson NJ, Meechan JG, et al.** “The interdisciplinary management of hypodontia: background and role of paediatric dentistry”. *Br Dent J.* **2003** Mar 8;194(5):245-51.
- 62) **Nussbaum B, Carrel R.** “ The behavior modification of a dentally disabled child”. *ASDC J Dent Child.* **1976** Jul-Aug;43(4):255-61.
- 63) **Pettit S, Campbell PR.** “Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome: the oral hygiene management of a patient with EEC”. *Spec Care Dentist.* 2010 Nov-Dec;30(6):250-4. doi: 10.1111/j.1754-4505.2010.00162.x.
- 64) **Pigno MA, Blackman RB, Cronin RJ Jr, Cavazos E.** “ Prosthodontic management of ectodermal dysplasia: a review of literature”. *J Prosthet Dent.* **1996** Nov;76(5):541-5.
- 65) **Pinheiro M, Freire-Maia N.** “Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review”. *Am J Med Genet.* **1994** Nov 1;53(2):153-62. Review.

- 66) **Pipa Vallejo A, López Arranz Monje E, González García M, Martínez Fernández M, Blanco Moreno Alvarez Buylla F.** “Treatment with removable prosthesis in hypohidrotic ectodermal dysplasia. A clinical case”. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. **2008** Feb 1;13(2):E119-23.
- 67) **Pispa J, Thesleff I.** “Mechanisms of ectodermal organogenesis”. *Dev Biol*. **2003** Oct 15;262(2):195-205.
- 68) **Priolo M, Silengo M, Lerone M, Ravazzolo R.** “Ectodermal dysplasias: not only 'skin' deep”. *Clin Genet*. **2000** Dec; 58(6):415-30. Review.
- 69) **Priolo M, Laganà C.** “Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification”. *J Med Genet*. **2001** Sep;38(9):579-85.
- 70) **Präger TM, Finke C, Miethke RR.** “Dental findings in patients with ectodermal dysplasia”. *J Orofac Orthop*. **2006** Sep;67(5):347-55. English, German.
- 71) **Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, et al.** “Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression”. *Development*. **2007** Jan;134(1):117-25.
- 72) **Ryan FS, Mason C, Harper JI.** “Ectodermal dysplasia--an unusual dental presentation”. *J Clin Pediatr Dent*. **2005** Fall;30(1):55-7.
- 73) **Ruhin B, Martinot V, Lafforgue P, Catteau B, Manouvrier-Hanu S, Ferri J.** “Pure ectodermal dysplasia: retrospective study of 16 cases and literature review”. *Cleft Palate Craniofac J*. **2001** Sep;38(5):504-18.
- 74) **Ruiz-Perez VL, Tompson SW, Blair HJ, Espinoza-Valdez C, Lapunzina P, Silva EO, et al.** “Mutations in two nonhomologous genes in a head-to-head configuration cause Ellis-van Creveld syndrome”. *Am J Hum Genet*. **2003** Mar;72(3):728-32.
- 75) **Sarnäs KV, Rune B.** “The facial profile in advanced hypodontia: a mixed longitudinal study of 141 children”. *Am J Orthod*. **1983** Sep;84(3):231-47.

- 76) **Segurado Rodríguez MA, Ortiz De Frutos FJ, Cornejo Navarro P, Rodríguez Peralto JL, Sánchez Del Pozo J, Guerra Tapia A, et al.** “Hypohidrotic ectodermal dysplasia: A cause of fever of unknown origin”. *An Esp Pediatr.* **2002** Mar;56(3):253-7.
- 77) **Schmidt-Ullrich R, Paus R.** “Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis”. *Bioessays.* **2005** Mar;27(3):247-61. Review.
- 78) **Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, et al.** “TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration”. *Neuron.* **2005** Feb 3;45(3):353-9.
- 79) **Srivastava AK, Durmowicz MC, Hartung AJ, Hudson J, Ouzts LV, Donovan DM, et al.** “Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice”. *Hum Mol Genet.* **2001** Dec 15;10(26):2973-81.
- 80) **Sweeney IP, Ferguson JW, Heggie AA, Lucas JO.** “ Treatment outcomes for adolescent ectodermal dysplasia treated with dental implants”. *Int J Paediatr Dent.* **2005** Jul;15(4):241-8.
- 81) **Tarjan I, Gabris K, Rozsa N.** “Early prosthetic treatment of patients with ectodermal dysplasia: a clinical report”. *J Prosthet Dent.* **2005** May;93(5):419-24.
- 82) **Tsai PF, Chiou HR, Tseng CC.** “Oligodontia--a case report”. *Quintessence Int.* **1998** Mar;29(3):191-3.
- 83) **Ulusu T, Alacam A, Iscan HN, Ucuncu N.** “Relation of ectodermal dysplasia and hypodontia”. *J Clin Pediatr Dent.* **1990** Fall;15(1):46-50.
- 84) **van der Hout AH, Oudesluijs GG, Venema A, Verheij JB, Mol BG, Rump P, Brunner HG, et al.** “Mutation screening of the Ectodysplasin-A receptor gene EDAR in hypohidrotic ectodermal dysplasia”. *Eur J Hum Genet.* **2008** Jun;16(6):673-9..
- 85) **Wang LL, Levy ML, Lewis RA, Chintagumpala MM, Lev D, Rogers M, et al.** “Clinical manifestations in a cohort of 41 Roth mund-Thomson syndrome patients”. *Am J Med Genet.* **2001** Jul 22;102(1):11-7.



- 86) **Wong AT, McGrath C, McMillan AS.** “Oral health of southern Chinese children and adolescents with severe hypodontia”. *Int J Paediatr Dent.* **2005** Jul;15(4):256-63.
- 87) **Wright JT, Morris C, Clements SE, D'Souza R, Gaide O, Mikkola M,** et al. “Classifying ectodermal dysplasias: Incorporating the molecular basis and pathways (Workshop II)”. *Am J Med Genet A.* **2009** Sep;149A(9):2062-7.
- 88) **www.assoande.it/**
- 89) **Yavuz I, Baskan Z, Ulku R, Dulgergil TC, Dari O, Ece A, Yavuz Y, Dari KO.** “Ectodermal dysplasia: Retrospective study of fifteen cases”. *Arch Med Res.* **2006** Apr;37(3):403-9.

#### BIBLIOGRAFIA CAP. 2

- 1) **Alio JJ, Lorenzo J, Iglesias C.** “Cranial base growth in patients with Down syndrome: a longitudinal study”. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* **2008** May;133(5):729-37.
- 2) **Alpöz AR, Eronat C.** “Taurodontism in children associated with trisomy 21 syndrome”. *J Clin Pediatr Dent.* **1997** Fall;22(1):37-9.
- 3) **Antonarakis SE, Epstein CJ.** “The challenge of Down syndrome”. *Trends Mol Med.* **2006** Oct;12(10):473-9.
- 4) **Asha KR, Lakshmiprabha S, Nanjaiah CM, Prashanth SN.** “Craniofacial anthropometric analysis in Down syndrome”. *Indian J Pediatr.* **2011** Sep;78(9):1091-5.
- 5) **Aylward EH, Habbak R, Warren AC, Pulsifer MB, Barta PE, Jerram M, Pearlson GD.** “Cerebellar volume in adults with Down syndrome”. *Arch Neurol.* **1997** Feb;54(2):209-12.
- 6) **Bal S, Elshershari H, Celiker R, Celiker A.** “Thoracic sequels after thoracotomies in children with congenital cardiac disease”. *Cardiol Young.* **2003** Jun;13(3):264-7.
- 7) **Barnett ML, Friedman D, Kastner T.** “The prevalence of mitral valve prolapse in patients with Down's syndrome: implications for dental management”. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **1988** Oct;66(4):445-7.

- 8) **Bell J, Civil CR, Townsend GC, Brown RH.** “The prevalence of taurodontism in Down's syndrome”. *J Ment Defic Res.* **1989** Dec;33 ( Pt 6):467-76.
- 9) **Bennet GC, Rang M, Roye DP, Aprin H.** “Dislocation of the hip in trisomy 21”. *J Bone Joint Surg Br.* **1982**;64(3):289-94.
- 10) **Bittles AH, Glasson EJ.** “Clinical, social, and ethical implications of changing life expectancy in Down syndrome.” *Dev Med Child Neurol.* **2004** Apr;46(4):282-6.
- 11) **Carter DM, Jegasothy BV.** “Alopecia areata and Down syndrome”. *Arch Dermatol.* **1976** Oct;112(10):1397-9.
- 12) **Coehn MM, Winer RA.** “Dental and facial characteristics in Down's syndrome (Mongolism)”. *J Dent Res.* **1965** Jan-Feb;44:SUPPL:197-208.
- 13) **Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, McBride E, Connor JM.** “Combined ultrasound and biochemical screening for Down's syndrome in the first trimester: a Scottish multicentre study”. *BJOG.* **2002** Jun;109(6):667-76.
- 14) **de Moraes ME, de Moraes LC, Dotto GN, Dotto PP, dos Santos LR.** “Dental anomalies in patients with Down syndrome”. *Braz Dent J.* **2007**;18(4):346-50.
- 15) **de Moura CP, Vales F, Andrade D, Cunha LM, Barros H, Puschel SM, Clemente MP.** “Rapid maxillary expansion and nasal patency in children with Down syndrome”. *Rhinology.* **2005** Jun;43(2):138-42.
- 16) **Diamond LS, Lynne D, Sigman B.** “Orthopedic disorders in patients with Down's syndrome”. *Orthop Clin North Am.* **1981** Jan;12(1):57-71.
- 17) **Dogliotti G, Galliera E, Licastro F, Corsi MM.** “Age-related changes in plasma levels of BDNF in Down syndrome patients”. *Immun Ageing.* **2010** Jan 25;7:2.
- 18) **Donaldson JD, Redmond WM.** “Surgical management of obstructive sleep apnea in children with Down syndrome”. *J Otolaryngol.* **1998.** 17:398-403
- 19) **Donnelly LF, Shott SR, LaRose CR, Chini BA, Amin RS.** “Causes of persistent obstructive sleep apnea despite previous tonsillectomy and adenoidectomy in children with down syndrome as depicted on static and dynamic cine MRI”. *AJR Am J Roentgenol.* **2004** Jul;183(1):175-81.

- 20) **Ferguson-Smith MA, Yates JR.** “Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses”. *Prenat Diagn.* 1984 Spring;4 Spec No:5-44.
- 21) **Fisch H, Hyun G, Golden R, Hensle TW, Olsson CA, Liberson GL.** “The influence of paternal age on down syndrome”. *J Urol.* 2003 Jun;169(6):2275-8.
- 22) **Fort P, Lifshitz F, Bellisario R, Davis J, Lanes R, Pugliese M, et al.** “Abnormalities of thyroid function in infants with Down syndrome”. *J Pediatr.* 1984 Apr;104(4):545-9.
- 23) **Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, et al.** “Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project”. *Genet Med.* 2008 Mar;10(3):173-80.
- 24) **Frid C, Drott P, Lundell B, Rasmussen F, Annerén G.** “Mortality in Down's syndrome in relation to congenital malformations”. *J Intellect Disabil Res.* 1999 Jun;43 ( Pt 3):234-41.
- 25) **Gamis AS.** “Acute myeloid leukemia and **Down syndrome** evolution of modern therapy--state of the art review”. *Pediatr Blood Cancer.* 2005 Jan;44(1):13-20.
- 26) **Gasbarrini G, Malandrino N, Giorgio V, Fundarò C, Cammarota G, Merra G, et al.** “Celiac disease: what's new about it?”. *Dig Dis.* 2008;26(2):121-7.
- 27) **Gasparini G, Saltarel A, Carboni A, Maggiulli F, Becelli R.** “Surgical management of macroglossia: discussion of 7 cases”. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Nov;94(5):566-71.
- 28) **Glasson EJ, Sullivan SG, Hussain R, Petterson BA, Montgomery PD, Bittles AH.** “The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling.”. *Clin Genet.* 2002 Nov;62(5):390-3.
- 29) **Gorlin RJ, Cohen MM, & Hennekam RCM.** ”Syndromes of the Head and Neck, 4th edn. Oxford University Press, Oxford, pp.35-76.

- 30) **Guihard-Costa AM, Khung S, Delbecque K, Ménez F, Delezoide AL.** “Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21”. *Pediatr Res.* **2006** Jan;59(1):33-8.
- 31) **Guimaraes CV, Donnelly LF, Shott SR, Amin RS, Kalra M.** “Relative rather than absolute macroglossia in patients with Down syndrome: implications for treatment of obstructive sleep apnea”. *Pediatr Radiol.* **2008** Oct;38(10):1062-7.
- 32) **Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M.** “Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome”. *Lancet.* **2000** Jan 15;355(9199):165-9.
- 33) **Hill DA, Gridley G, Cnattingius S, Mellemkjaer L, Linet M, Adami HO, et al.** “Mortality and cancer incidence among individuals with Down syndrome”. *Arch Intern Med.* **2003** Mar 24;163(6):705-11.
- 34) **Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A.** “GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome”. *Blood.* **2003** Jun 1;101(11):4301-4.
- 35) **Horbelt CV.** “Down syndrome: a review of common physical and oral characteristics”. *Gen Dent.* **2007** Sep-Oct;55(5):399-402.
- 36) **Hyde LA, Crnic LS.** “Age-related deficits in context discrimination learning in Ts65Dn mice that model Down syndrome and Alzheimer's disease”. *Behav Neurosci.* **2001** Dec;115(6):1239-46.
- 37) **Jacobs IN, Gray RF, Todd NW.** “Upper airway obstruction in children with Down syndrome”. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **1996** Sep;122(9):945-50.
- 38) **Jaspers MT.** “Taurodontism in the Down syndrome”. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **1981** Jun;51(6):632-6.
- 39) **Karlsson B, Gustafsson J, Hedov G, Ivarsson SA, Annerén G.** “Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity”. *Arch Dis Child.* **1998** Sep;79(3):242-5.
- 40) **Kavanagh KT, Kahane JC, Kordan B.** “Risks and benefits of adenotonsillectomy for children with Down syndrome”. *Am J Ment Defic.* **1986** Jul;91(1):22-9.

- 41) **Kieser J, Townsend G, Quick A.** “The Down syndrome patient in dental practice, part I: Pathogenesis and general and dental features”. *N Z Dent J.* **2003** Mar;99(1):5-9
- 42) **Kucera J, Dolezalová V.** “Prenatal development of malformed fetuses at 28-42 weeks of gestational age (anencephalus, hydrocephalus, Down's syndrome, cleft lip and palate, and hypospadias)”. *Biol Neonate.* **1973**;22(3):319-24.
- 43) **Lauridsen H, Hansen BF, Reintoft I, Keeling JW, Skovgaard LT, Kjaer I.** “Short hard palate in prenatal trisomy 21”. *Orthod Craniofac Res.* **2005** May;8(2):91-5.
- 44) **Lejeune J, Turpin R, Gautier M.** “Mongolism; a chromosomal disease (trisomy).” *Bull Acad Natl Med.* **1959** Apr 7-14;143(11-12):256-65.
- 45) **Locke GR, Gardner JI, Van Epps EF.** “Atlas-dens interval (ADI) in children: a survey based on 200 normal cervical spines”. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* **1966** May;97(1):135-40.
- 46) **Londhey VA, Rajadhyaksh GC, Barhate KS, More AV, Dedhia CR.** “Hyperthyroidism in a case of Down syndrome”. *J Assoc Physicians India.* **2010** Sep;58:568-9.
- 47) **Madan V, Williams J, Lear JT.** “Dermatological manifestations of Down's syndrome”. *Clin Exp Dermatol.* **2006** Sep;31(5):623-9. Review.
- 48) **Mademont-Soler I, Morales C, Clusellas N, Soler A, Sánchez A; Group of Cytogenetics from Hospital Clínic de Barcelona.** “Prenatal cytogenetic diagnosis in Spain: analysis and evaluation of the results obtained from amniotic fluid samples during the last decade”. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **2011** Aug;157(2):156-60.
- 49) **Malini SS, Ramachandra NB.** “Influence of advanced age of maternal grandmothers on Down syndrome”. *BMC Med Genet.* **2006** Jan 14;7:4.
- 50) **Marcus CL, Keens TG, Bautista DB, von Pechmann WS, Ward SL.** “Obstructive sleep apnea in children with Down syndrome”. *Pediatrics.* **1991** Jul;88(1):132-9.
- 51) **Meins W.** “Are depressive mood disturbances in adults with Down's syndrome an early sign of dementia?”. *J Nerv Ment Dis.* **1995** Oct;183(10):663-4.

- 52) **Milbrandt TA, Johnston CE 2nd.** “Down syndrome and scoliosis: a review of a 50-year experience at one institution”. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Sep 15;30(18):2051-5.
- 53) **Murphy M, Insoft RM, Pike-Nobile L, Epstein LB.** “A hypothesis to explain the immune defects in Down syndrome”. *Prog Clin Biol Res.* 1995; 393:147-67.
- 54) **Myers BA, Pueschel SM.** “Psychiatric disorders in persons with Down syndrome”. *J Nerv Ment Dis.* 1991 Oct;179(10):609-13.
- 55) **Niebuhr E.** “Down's syndrome. The possibility of a pathogenetic segment on chromosome no. 21”. *Humangenetik.* 1974 Jan 22;21(1):99-101.
- 56) **Noble RL, Warren RP.** “Analysis of blood cell populations, plasma zinc and natural killer cell activity in young children with Down's syndrome”. *J Ment Defic Res.* 1988 Jun;32 ( Pt 3):193-201.
- 57) **Pangalos C, Avramopoulos D, Blouin JL, Raoul O, deBlois MC, Prieur M, et al.** “Understanding the mechanism(s) of mosaic trisomy 21 by using DNA polymorphism analysis”. *Am J Hum Genet.* 1994 Mar;54(3):473-81.
- 58) **Patterson D.** “Genetic mechanisms involved in the phenotype of Down syndrome.” *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2007;13(3):199-206. Review.
- 59) **Penrose LS.** “The incidence of mongolism in the general population.” *J Ment Sci.* 1949 Jul;95(400):685-8.
- 60) **Philip R, Berger AC, McManus NH, Warner NH, Peacock MA, Epstein LB.** “Abnormalities of the in vitro cellular and humoral responses to tetanus and influenza antigens with concomitant numerical alterations in lymphocyte subsets in Down syndrome (trisomy 21)”. *J Immunol.* 1986 Mar 1;136(5):1661-7.
- 61) **Pizzutillo PD, Herman MJ.** “Cervical spine issues in Down syndrome”. *J Pediatr Orthop.* 2005 Mar-Apr;25(2):253-9. Review.
- 62) **Pueschel SM, Scola FH, Tupper TB, Pezzullo JC.** “Skeletal anomalies of the upper cervical spine in children with Down syndrome”. *J Pediatr Orthop.* 1990 Sep-Oct;10(5):607-11.
- 63) **Rajić Z, Mestrović SR.** “Taurodontism in Down's syndrome”. *Coll Antropol.* 1998 Dec;22 Suppl:63-7.

- 64) **Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, et al.** "A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits". *Nat Genet.* **1995** Oct;11(2):177-84.
- 65) **Richtsmeier JT, Baxter LL, Reeves RH.** "Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice". *Dev Dyn.* **2000** Feb;217(2):137-45.
- 66) **Roche AF, Steward FS, Sunderland S.** "Nonmetrical observations on cranial roentgenograms in mongolism". *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* **1961** Apr;85:659-62.
- 67) **Roizen NJ, Patterson D.** "Down's syndrome". *Lancet.* **2003** Apr 12;361(9365):1281-9
- 68) **Rozner L.** "Down's syndrome and tongue size". *Med J Aust.* **1984** Aug 4;141(3):196-7.
- 69) **Rumble B, Retallack R, Hilbich C, Simms G, Multhaup G, Martins R, et al.** "Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease". *N Engl J Med.* 1989 Jun 1;320(22):1446-52.
- 70) **Sartorelli EM, Mazzucatto LF, de Pina-Neto JM.** "Effect of paternal age on human sperm chromosomes". *Fertil Steril.* **2001** Dec;76(6):1119-23.
- 71) **Schmied C, Saurat HJ.** "Epidemiology of atopic dermatitis". *Ann Dermatol Venereol.* **1989**;116(10):729-34. Review.
- 72) **Schreinemachers DM, Cross PK, Hook EB.** "Rates of trisomies 21, 18, 13 and other chromosome abnormalities in about 20 000 prenatal studies compared with estimated rates in live births". *Hum Genet.* **1982**;61(4):318-24.
- 73) **Schupf N, Sergievsky GH.** "Genetic and host factors for dementia in Down's syndrome". *Br J Psychiatry.* **2002** May;180:405-10. Review.
- 74) **Scully C.** "Down's syndrome and dentistry". *Dent Update.* **1976** Jul-Aug;3(4):193-6.
- 75) **Scully C.** "Down's syndrome: aspects of dental care". *J Dent.* **1976** Jul;4(4):167-74.

- 76) **Sforza C, Dellavia C, Dolci C, Donetti E, Ferrario VF.** “A quantitative three-dimensional assessment of abnormal variations in the facial soft tissues of individuals with Down syndrome”. *Cleft Palate Craniofac J.* **2005** Jul;42(4):410-6.
- 77) **Shalitin S, Phillip M.** “Autoimmune thyroiditis in infants with Down's syndrome”. *J Pediatr Endocrinol Metab.* **2002** May;15(5):649-52.
- 78) **Shaw ED, Beals RK.** “The hip joint in Down's syndrome. A study of its structure and associated disease”. *Clin Orthop Relat Res.* **1992** May;(278):101-7.
- 79) **Silverman W.** “Down syndrome: cognitive phenotype.” *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* **2007**;13(3):228-36.
- 80) **Southall DP, Stebbens VA, Mirza R, Lang MH, Croft CB, Shinebourne EA.** “Upper airway obstruction with hypoxaemia and sleep disruption in Down syndrome”. *Dev Med Child Neurol.* **1987** Dec;29(6):734-42.
- 81) **Sureshbabu R, Kumari R, Ranugha S, Sathyamoorthy R, Udayashankar C, Oudeacoumar P.** “Phenotypic and dermatological manifestations in Down Syndrome”. *Dermatol Online J.* **2011** Feb 15;17(2):3.
- 82) **Ugazio AG, Maccario R, Notarangelo LD, Burgio GR.** “Immunology of Down syndrome: a review”. *Am J Med Genet Suppl.* **1990**;7:204-12. Review.
- 83) **Urv TK, Zigman WB, Silverman W.** “Psychiatric symptoms in adults with Down syndrome and Alzheimer's disease”. *Am J Intellect Dev Disabil.* **2010** Jul;115(4):265-76.
- 84) **Vis JC, Duffels MG, Winter MM, Weijerman ME, Cobben JM, Huisman SA, Mulder BJ.** “Down syndrome: a cardiovascular perspective”. *J Intellect Disabil Res.* **2009** May;53(5):419-25.
- 85) **Wald NJ, Cukle HS, Densem W .** “Maternal serum screening for Down's Syndrome in early pregnancy”. *BMJ.* **1988.** 297:753.
- 86) **Weijerman ME, de Winter JP.** “Clinical practice. The care of children with Down syndrome”. *Eur J Pediatr.* **2010** Dec;169(12):1445-52.
- 87) **Whaley WJ, Gray WD.** “Atlantoaxial dislocation and Down's syndrome”. *Can Med Assoc J.* **1980** Jul 5;123(1):35-7.



- 88) Yaron Y, Mashiach R. "First-trimester biochemical screening for Down syndrome". *Clin Perinatol*. 2001 Jun;28(2):321-31, viii. Review.
- 89) Zipursky A. "Susceptibility to leukemia and resistance to solid tumors in Down syndrome". *Pediatr Res*. 2000 Jun;47(6):704.

### BIBLIOGRAFIA CAP. 3

- 1) Albandar JM, et al. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol*. 1997 Oct;68(10):973-81.
- 2) Aleva NA, et al. Erythematous candidosis in patients with complete dentures and HIV+/AIDS. *Mycoses*. 2007 Sep;50(5):407-11.
- 3) Almomani F, et al. The effect of an oral health promotion program for people with psychiatric disabilities. *Psychiatr Rehabil J*. 2006 Spring;29(4):274-81.
- 4) Amano A, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol*. 2000 Feb; 71(2):249-55.
- 5) Amano A, et al. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome 2001 Mar;72(3):368-73.
- 6) Amin M, et al. Induction of de novo subcortical actin filament assembly by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3650-3654.
- 7) Arakawa S, et al. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 2000 Aug;68(8):4611-5.
- 8) Assuma R, et al. IL-1/TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*. 1998 Jan 1; 160(1):403-9.
- 9) Becker MR, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood causes. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40:1001-1009
- 10) Baehni P, et al. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun*. 1979 Apr;24(1):233-43.

- 11) **Barberia-Leache E, et al.** Etiopathogenic analysis of the caries on three patients with Noonan Syndrome. *Med Oral* **2003**;8:136-42.
- 12) **Berghon D, et al.** A multi-country comparison of caries associated microflora in demographically diverse children. *Community Dent Health*. **2004**; 21:96-101
- 13) **Berkawitz R.** Etiology of nursing caries: a microbiologic prespective. *L. Public Health Dent*. **1996**; 56:51-54
- 14) **Bunt BA, et al.** Stability of selcted plaque species and then relationship to carie in child population over 2 years. *Caries Res*. **1985**; 19:193-200
- 15) **Brambilla E, et al.** Caries prevention during pregnancy: results of a 30-month study. *J Am Dent Assoc*. **1998** Jul;129(7):871-7.
- 16) **Caufield BW, et al.** Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J. Dent. Res*. **1993**;72:37-45
- 17) **Caufield BW, et al.** Natural history of *S. sanguinis* in the oral cavità of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*. **2002**; 68:4018-4023
- 18) **Challacombe SJ, et al.** The effects of HIV infection on oral mucosal immunity. *Adv Dent Res*. **2006** Apr 1;19(1):29-35. Review.
- 19) **Cutler CW, et al.** Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol*. **1995** Feb;3(2):45-51. Review.
- 20) **Czuprynski CJ, et al.** Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. *Trends Microbiol*. **1995** Dec;3(12):480-3. Review.
- 21) **Diaz PI.** "Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities". *Front Oral Biol*. **2012**;15:17-40. Review.
- 22) **Epstein JB, et al.** Oral topical steroids and secondary oral candidiasis. *J Oral Med*. **1986** Oct-Dec;41(4):223-7, 273.
- 23) **Fenno JC, et al.** Cytopathic effects of the major surface protein and the chymotrypsinlike protease of *Treponema denticola*. *Infect Immun*. **1998** May;66:1869-1877.
- 24) **Genco CA, et al.** A novel mouse model to study the virulence of and host response to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *Infect Immun*. **1991** Apr;59(4):1255-63.
- 25)

- 26) Günay H, et al.** Effect on caries experience of a long-term preventive program for mothers and children starting during pregnancy. *Clin Oral Investig.* **1998** Sep;2(3):137-42.
- 27) Hicks J, et al.** Biological factors in dental caries:role of saliva ora dental claue in the dynamic process of demineralization and remineralization (part I). *J. Clin. Pediatr Dent.* **2003**; 28:47-52
- 28) Holt SC, et al.** Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Biol Med.* **1991**; 2(2):177–281.
- 29) Iwaki M, et al.** Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun.* **1990** Sep;58(9):2929-34.
- 30) Linossier A, et al.** Quantitative relationship between salivary level of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in children with Down's syndrome. *Med Oral.* **2002** Jul-Oct;7(4):284-92.
- 31) Leung NM, et al.** Oral bacteria in plaque and invading buccal cells of young orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* **2006** Dec;130(6):698.e11-8.
- 32) Loesche WJ et al.** Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* **1986**; 50:353-380
- 33) Loesche WJ, et al.** Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molaris shortly after eruption. *Infect. Immun.* **1984**; 46:765-772
- 34) López NJ, et al.** Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol.* **2000** Jun;71(6):948-54.
- 35) Marchant S, et al.** The predominant microflora of nursing caries lesion. *Caries Rev.* **2001**; 35:397-406
- 36) Mathers DA, et al.** The major surface protein complex of *Treponema denticola* depolarize and induces ion channels in HeLa cell membranes. *Infect Immun.* **1996** Aug;64(8):2904-10.
- 37) Moncla BJ, et al.** Rapid presumptive identification of black-pigmented gram-negative anaerobic bacteria by using 4-methylumbelliferone derivatives. *J Clin Microbiol.* **1991** Sep;29(9):1955-8.

- 38) Naranjo AA, et al.** Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* **2006** Sep;130(3):275.e17-22.
- 39) Nicolas GG, Lavoie MC.** “*Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental plaque”. *Can J Microbiol.* **2011** Jan;57(1):1-20. Review.
- 40) Nualart Grollmus Z, et al.** Periodontal disease associated to systemic genetic disorder. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2007** May 1;12(3):E211-5.
- 41) Olsen I,** Attachment of *Treponema denticola* to cultured human epithelial cells. *Scand J Dent Res.* **1984** Feb;92(1):55-63.
- 42) Perez LA, et al.** Treatment of periodontal disease in a patient with Ehlers-Danlos Syndrome. A case Report and literature review. *J Periodontol.* **2002**;73:564-70.
- 43) Pienaar ED, et al.** Interventions for the prevention and management of oropharyngeal candidiasis associated with HIV infection in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* **2006** Jul 19;3:CD003940. Review.
- 44) Potempa J, et al.** *Porphyromonas gingivalis* proteinases in periodontitis, a review. *Acta Biochim Pol.* **1996**;43(3):455-65. Review.
- 45) Prentice AG,** Oral and gastrointestinal candidosis: prophylaxis during immunosuppressive therapy. *Mycoses.* **1989**;32 Suppl 2:42-6.
- 46) Reintjens F, et al.** Adherence of oral treponemes and their effect on morphological damage and detachment of epithelial cells in vitro. *Infect Immun.* **1986** Feb;51:642-647.
- 47) Ribeiro EL, et al.** Detection of phospholipolytic *Candida albicans* isolated from saliva of children with Down's syndrome. *Acta Med Port.* **2002** May-Jun;15(3):171-4.
- 48) Ribeiro EL, et al.** Phenotypic aspects of oral strains of *Candida albicans* in children with Down's syndrome. *Braz J Biol.* **2006** Aug;66(3):939-44.
- 49) Robertson PB, et al.** Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* **1982** May;17(3):275-83.
- 50) Rudney JD, et al.** Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun.* **2001** Apr;69(4):2700-7.

- 51) Sakellari D, et al.** Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. *A case report. J Clin Periodontol.* **2005** Jun;32(6):684-690.
- 52) Scully C, et al.** Down syndrome: lip lesions (angular stomatitis and fissures) and *Candida albicans*. *Br J Dermatol.* **2002** Jul;147(1):37-40.
- 53) Sela MN, et al.** Characterization of treponemes isolated from human and non-human primate periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol.* **1987** Mar;2(1):21-9.
- 54) Seminario A, Broukal Z, Ivancaková R.** “Mutans streptococci and the development of dental plaque”. *Prague Med Rep.* **2005**;106(4):349-58. Review.
- 55) Simain F, Rompen E, Heinen E.** ”Dental biofilms”. *Rev Med Liege.* **2010** Oct;65(10):569-73.
- 56) Socransky SS, Haffajee AD.** “The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts”. *J Periodontol.* **1992** Apr;63(4 Suppl):322-31. Review.
- 57) Straub AM, et al.** Severe periodontitis in Merfan’s Syndrome: *A Case Report. J Periodontol* **2002**;73:823-6.
- 58) Tanner AC, et al.** API ZYM and API An-Ident reactions of fastidious oral gram-negative species. *J Clin Microbiol.* **1985** Sep;22(3):333-5.
- 59) Thomas DD, et al.** *Treponema pallidum* invades intracellular junctions of endothelial cell monolayers. *Proc Natl Acad Sci.* **1988** USA May;85(10):3608–3612.
- 60) Tsai CC, et al.** Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun.* **1979** Jul;25(1):427-39.
- 61) Uitto VJ, et al.** Cytopathic effects of *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase on migrating and stratified epithelial cells. *Infect Immun.* **1995** Sep;63(9):3401–3410.
- 62) Uitto VJ, et al.** Isolation of a chymotrypsinlike enzyme from *Treponema denticola*. *Infect Immun.* **1988** Oct;56(10):2717-22.
- 63) Ullbro C, et al.** Preventive periodontal regimen in Papillon-Lefèvre Syndrome. *Pedriatr Dent.* **2005**;27:226-32.

**64) Weinberg A, et al.** Chemical and Biological activities of a 64-kilodalton outer sheath protein from *Treponema denticola* strains. *J Bacteriol.* **1991** Nov;173(21):6935-6947.

**65) Wolff L, et al.** Bacteria as risk markers for periodontitis. *J. Periodontol.* **1994** May;65(5 suppl):498–510.